

**Entwicklung und erfahrungsabhängige Plastizität
neuronaler Mechanismen für Schalllokalisation
bei Säugern**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

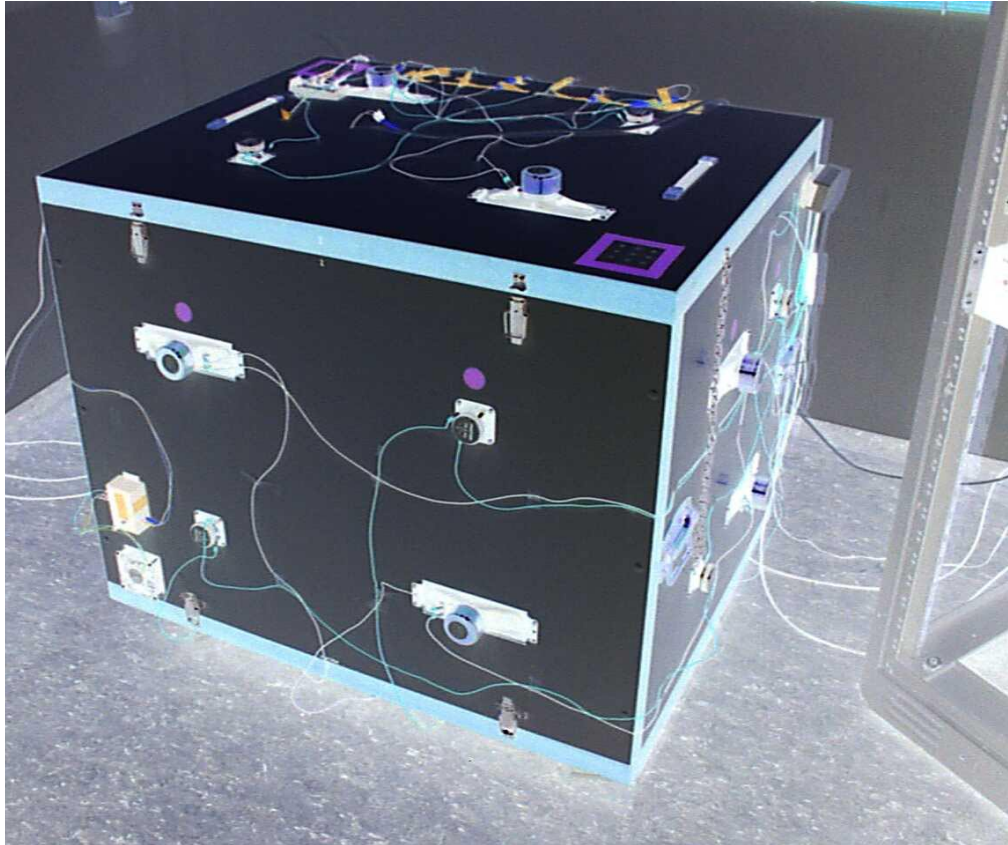
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Armin H. Seidl

aus München

Oktober 2003



Noisebox, invers dargestellt. Siehe auch Abbildung 14, Seite 25.

**Entwicklung und erfahrungsabhängige Plastizität
neuronaler Mechanismen für Schalllokalisation
bei Säugern**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Armin H. Seidl

aus München

Oktober 2003

1. Gutachter: Prof. Benedikt Grothe

2. Gutachter: Prof. Gerhard Neuweiler

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 2003

für meine Eltern

Franziska Katharina und Johann Georg Seidl

Von nahem gesehen, sah dieses Pflaster interessant aus, es gab sogar einen Riß, der durch den Asphalt lief, und in dem Riß sproß ein Grashalm. Wenn das so ist, dachte ich, kannst Du auch aufstehen.

Jörg Fauser, Rohstoff

DANKSAGUNG

Der größte Dank gebührt natürlich Benedikt Grothe, der mir diese Arbeit ermöglicht hat. Ohne sein wissenschaftliches Konzept wären unsere Ergebnisse nicht entstanden. Benedikt war immer zugänglich für wissenschaftliche Fragen oder persönliche Probleme. Nicht zuletzt durch seine Offenheit und seinen emotionalen Beitrag sorgte er dafür, dass aus der Doktorarbeit auch eine Periode der persönlichen Entwicklung wurde.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe, den Grothes, bedanken. Vor allem bei Tini Reiter und Torsten Marquardt für die gleiche Ebene.

Hermann Schweizer und Martin Korte danke ich für das Mitmachen in meinem thesis committee, sowie für die wissenschaftlichen und persönlichen Ratschläge, und auch Professor Gerhard Neuweiler für das Zweitgutachten zu dieser Arbeit.

Ich möchte mich auch bei allen Mitgliedern (siehe Anhang) der Abteilung Bonhoeffer für die gute Zeit die ich am MPI für Neurobiologie hatte, danken. Vor allem Tobias Bonhoeffer, für die gute Leitung und den Rest, Nicola Tobisch und Sven Schütt für den Spaß und die guten Freunde.

Vielen Dank an Claire Creutzfeldt, Nicola Tobisch, Albrecht Kossel und Claudius Mott für die kritischen Kommentare zu dieser Arbeit.

Frau Bühringer möchte ich für die Anfertigung der EM-Bilder und Gerhard Breutel für das Programmieren der Digitrace-Makros danken.

Ohne die jahrelange Aufzucht, Aufopferung und Unterstützung meiner Eltern wäre mein Leben so nicht möglich gewesen. Dafür werde ich ihnen immer dankbar sein.

Dann gibt es natürlich noch Menschen ohne deren Freundschaft, blindes Verständnis und mentale Unterstützung nichts so gut gewesen wäre wie es eben war. Zu diesen Menschen gehören vor allem Claire Creutzfeldt, mein Bruder Alexander, Imke Hermann, Claudius Mott und Stefan Rüffer.

Danke auch an Wouter Dorigo für die Kletterklassiker während dem Zusammenschreiben.

INHALT

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Schalllokalisation	3
2.2	binaurale Kerne des oberen Olivenkomplexes	4
2.2.1	Die MSO und ihre Eingänge	6
2.2.2	ITD-Sensitivität der MSO	10
2.3	Kodierung von interauralen Zeitdifferenzen	14
2.4	Ontogenie der inhibitorischen Eingänge zur MSO	19
2.5	Arbeitshypothesen und Fragestellungen	20
2.5.1	Erfahrungsabhängige Plastizität glyzinerger Synapsen an MSO Neuronen	20
2.5.2	Entwicklung der ITD-Sensitivität nach Hörbeginn	22
2.5.3	Fehlende Plastizität inhibitorischer Eingänge in der MSO der Ratte	22
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Versuchstiere	23
3.1.1	Die mongolische Wüstenrennmaus, <i>Meriones unguiculatus</i>	23
3.1.2	Die Ratte, <i>Rattus norvegicus</i>	23
3.2	Noisebox	23
3.3	Immunohistochemie	27
3.3.1	Perfusion	29
3.3.2	Glyzinrezeptor Fluoreszenzimmunohistochemie	29
3.3.3	Gephyrin Fluoreszenzimmunohistochemie	30
3.3.4	Gephyrin-DAB Immunohistochemie	30
3.3.5	Gephyrin-DAB Immunohistochemie für Elektronenmikroskopie	31
3.3.6	Konfokale Mikroskopie	31

3.3.7	Qualitative Weiterverarbeitung der Aufnahmen	33
3.3.8	Quantitative Analyse der Fluoreszenzfärbungen	34
3.3.9	Quantifizierung der DAB-Färbungen	36
3.4	Elektrophysiologie	37
3.4.1	Der DNLL	37
3.4.2	Präparation	38
3.4.3	Tiergruppen	43
3.4.4	Datenanalyse	43
4	ERGEBNISSE	45
4.1	Einfluss der Hörerfahrung auf die Verteilung glyzinerger Synapsen an MSO-Zellen der Wüstenrennmaus	45
4.1.1	Fluoreszenzdoppelfärbung	45
4.1.2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	54
4.1.3	Quantifizierung der Verteilung	57
4.2	Verteilung glyzinerger Synapsen an MSO-Zellen der Ratte	59
4.2.1	Qualitative Verteilung der Glyzinrezeptoren an MSO-Neuronen bei der Ratte	59
4.2.2	Entwicklungsabhängige Verteilung von Glyzinrezeptoren an MSO-Zellen der Ratte	65
4.2.3	Schwierigkeiten bei der Darstellung einzelner Neurone in der MSO der Ratte	69
4.3	Einfluss der Hörerfahrung auf die Verarbeitung von interauralen Zeitdifferenzen	74
4.3.1	Lage des DNLL der Wüstenrennmaus	74
4.3.2	ITD-Sensitivität im dorsalen Nukleus des lateralen Lemniskus	76
4.3.3	Onset- versus Ongoing-Komponente	87
4.3.4	Einfluss der Stimulusamplitude auf die ITD-Funktionen	89

4.3.5	Ratenintensitätsfunktionen und interaurale Intensitätsdifferenzen	98
4.3.6	ITD-Sensitivität im DNLL und MSO im Vergleich	102
4.3.7	ITD-Funktionen in jungen Wüstenrennmäusen	107
4.3.8	Einfluss der frühen Hörerfahrung auf die Entwicklung der ITD-Verarbeitung	112
4.3.9	Einfluss des Berausens auf ITD-Sensitivität bei adulten Tieren	118
4.3.10	Adulte Plastizität der ITD-Sensitivität	122
5	DISKUSSION	124
5.1	Erfahrungsabhängige Entwicklung der Verteilung glyzinerger Synapsen an Neuronen der medialen oberen Olive	125
5.2	Fehlende räumliche Begrenzung der inhibitorischen Synapsen an MSO-Zellen der Ratte	129
5.3	ITD-Sensitivität im DNLL	130
5.4	Erfahrungsabhängige Entwicklung der ITD-Sensitivität	134
5.5	Adulte Plastizität der ITD-Empfindlichkeit	140
5.6	Auswirkungen der Amplitude und von IIDs auf die ITD-Empfindlichkeit im DNLL	141
5.7	Schlussfolgerungen	142
5.8	Ausblick	143
6	LITERATUR	144
7	ANHANG	155
7.1	Abkürzungen	155
7.2	Immunohistochemieprotokolle	157
7.2.1	DAB-Immunohistochemie	161
7.2.2	Gephyrin-DAB (Ratte)	163
7.3	Veröffentlichungen	165

7.4	Mitglieder der Abteilung Bonhoeffer und Arbeitsgruppe Grothe während meiner Doktorarbeit	166
-----	---	-----

Schalllokalisation ist eine der wichtigsten Aufgaben unseres Hörsystems. Die Position von tieffrequenten Schallquellen wird vor allem auf der Basis von interauralen Zeitdifferenzen (ITD) bestimmt. Die Verarbeitung solcher ITDs findet in der medialen oberen Olive (MSO), einer Struktur des auditorischen Hirnstamms statt (Goldberg and Brown, 1969; Yin and Chan, 1990; Spitzer and Semple, 1995), die zum ersten Mal in der aufsteigenden Hörbahn binaurale akustische Information verarbeitet. Die Zellen in der MSO bekommen von beiden Ohren erregende und hemmende Eingänge. Ein zeitlich präzise abgestimmtes Zusammenspiel dieser vier Eingänge sorgt für die richtige Einstellung der ITD-Empfindlichkeit in der Wüstenrennmaus (Brand et al., 2002). Die Koinzidenz der erregenden Eingängen alleine erzeugt eine ITD-Sensitivität, die bei ca. 0 ITD ihre maximale Antwort hat. Dadurch liegt die maximale Steigung der ITD-Funktion außerhalb des physiologisch relevanten Bereiches. Die Inhibition sorgt dafür, dass die maximale Antwort in den contralateralen Bereich verschoben und somit die maximale Steigung der ITD-Funktion auf den Bereich der physiologisch relevanten ITDs abgestimmt wird. Die glyzinerger inhibitorischen Projektionen zur MSO der Wüstenrennmaus sind vor Hörbeginn noch diffus verteilt und innervieren Somata und Dendriten gleichermaßen. Weniger als zwei Wochen nach Hörbeginn sind diese hemmenden Eingänge jedoch auf die Somata der MSO-Neurone beschränkt (Seidl, 1999). Diese Beschränkung ist abhängig von binauraler Aktivität (Kapfer, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass diese Eliminierung der dendritischen inhibitorischen Eingänge in der Wüstenrennmaus durch die Aufzucht in omnidirektionalem weißem Rauschen während einer kritischen Periode nach Hörbeginn unterdrückt werden kann. Für die normale Entwicklung der räumlichen Verteilung der glyzinerger Synapsen in der MSO ist also normale akustische Erfahrung notwendig. Bei Tieren, die ITDs nicht zur Schalllokalisation verwenden, kommt es zu keiner solchen Entwicklung. Vor Hörbeginn und auch im Erwachsenenstadium sind die inhibitorischen Eingänge auf den Zellen der MSO gleichmäßig über Soma und Dendriten verteilt.

Als weiteres Ergebnis wird beschrieben, dass es eine Veränderung der ITD-Empfindlichkeit nach Hörbeginn gibt. Die Abstimmung der maximalen Steigungen der ITD-Funktionen auf den physiologischen Bereich nach Hörbeginn unterbleibt, wenn

die räumlichen akustischen Signale durch weißes Rauschen während der kritischen Periode maskiert werden. Diese Entwicklung korreliert mit der Verteilung der glyzinergen Synapsen an MSO-Neuronen. Werden erwachsene Tiere weißem Rauschen ausgesetzt, so kommt es zu einer Änderung der ITD-Empfindlichkeit, die reversibel ist, aber nicht mit der unterdrückten Entwicklung nach Hörbeginn vergleichbar ist.

Diese Arbeit zeigt, dass die korrekte strukturelle Entwicklung inhibitorischer Synapsen notwendig ist um die biophysikalische Grundlage für Schalllokalisationsmechanismen zu schaffen. Diese Entwicklung ist abhängig von der Erfahrung räumlicher akustischer Signale. Somit ist sie ein Beispiel für ein System, das sich direkt durch die Information die es später verarbeitet, selbst abstimmt und optimiert.

2 EINLEITUNG

Das menschliche Bewusstsein und die Wahrnehmung der Wirklichkeit wird maßgeblich durch unsere Umwelt bestimmt. Unsere Sinne machen uns zugänglich für Einflüsse von Außen indem sie die Aufnahme verschiedenster Informationen ermöglichen. Eines unserer wichtigsten Sinnessysteme ist das Hören. Hören ermöglicht uns die zwischenmenschliche Kommunikation durch akustisch artikulierte Sprache, die Aufnahme vielfältiger Klangeindrücke aus der Natur und nicht zuletzt den Genuss von Musik. Außerdem gestattet unser Hörsystem die Aufnahme von Informationen, die aufgrund ihrer Entfernung oder aufgrund von Dunkelheit dem Sehsystem nicht zugänglich sind. Die Lokalisation von Schall war früh in der Evolutionsgeschichte überlebenswichtig, um Beute zu finden oder Feinde zu erkennen. Schalllokalisation ermöglicht durch Schalltrennung außerdem die räumliche Zuordnung von verschiedenen Schallquellen.

2.1 SCHALLLOKALISATION

Die räumliche Zuordnung akustischer Informationen, die Schalllokalisation, ist eine der wichtigsten Aufgaben des Hörsystems. Abhängig von der Lage der Schallquelle relativ zum Zuhörer, arbeitet Schalllokalisation nach unterschiedlichen Methoden. Zur Lokalisation der Schallquelle im Azimut stehen zwei verschiedene Parameter zur Verfügung (Rayleigh, 1907): interaurale Zeitdifferenzen (engl. interaural time differences, ITD) und interaurale Intensitätsdifferenzen (engl. interaural intensity differences, IID). IIDs, die zwischen den beiden Ohren durch eine Abschwächung des Schalls am Kopf entstehen, sind der Hauptanhaltspunkt für die Ortung von hohen Frequenzen. Sogar Säugetiere mit relativ kleinen Köpfen, wie Fledermäuse oder Mäuse, können durch diese Intensitätsunterschiede die Herkunftsrichtung von Schall mit großer Genauigkeit auflösen (Heffner and Heffner, 1990).

Tieffrequenter Schall (< 1500 Hz Wellenlänge) wird von Hindernissen weniger reflektiert als hochfrequenter. Wenn die Wellenlänge des akustischen Stimulus größer ist als der Ohrabstand, sind die Intensitätsunterschiede zur Lokalisation praktisch nicht mehr verfügbar. Bedingt durch die räumliche Trennung ergeben sich aber Unterschiede in der Ankunftszeit des Schalls an beiden Ohren, also interaurale Zeitdifferenzen, ITDs.

Die erste Verarbeitung solcher ITDs findet in einer Struktur des auditorischen Hirnstamms von Säugern, der medialen oberen Olive statt (engl. medial superior olive, MSO) (Yin and Chan, 1990; Irvine, 1992). Die MSO ist eine Teilstruktur des oberen Olivenkomplexes (engl. superior olivary complex, SOC).

2.2 BINAURALE KERNE DES OBEREN OLIVENKOMPLEXES

Der obere Olivenkomplex im auditorischen Hirnstamm bildet die erste Station der afferenten Hörbahn. Er verarbeitet Eingänge von beiden Ohren und besteht aus bilateral angeordneten Strukturen. Der SOC setzt sich aus verschiedenen Neuronengruppen zusammen, die zu funktionellen Einheiten zusammengefasst werden, sogenannten Kerngebieten, (Abbildung 1). Wichtige Kerngebiete des SOC sind neben der MSO u.a. die laterale obere Olive (engl. lateral superior olive, LSO), der mediale und laterale Nukleus des Trapezkörpers (engl. medial nucleus of the trapezoid body, MNTB, bzw. lateral nucleus of the trapezoid body, LNTB) und der obere paraoliväre Nukleus (engl. superior paraolivary nucleus, SPN).

Die laterale obere Olive, auffällig durch ihre S-förmige Struktur, ist verantwortlich für die Verarbeitung der bereits erwähnten ITDs. Die LSO erhält erregende Eingänge von ipsilateral durch Neurone des ventralen Nucleus cochlearis (engl. ventral cochlear nucleus, VCN). Außerdem einen durch den Neurotransmitter Glyzin vermittelten hemmende Eingänge vom MNTB der gleichen Seite, der seinerseits vom contralateralen VCN erregt wird. Durch Subtraktion dieser Eingänge antworten LSO Neurone maximal bei Schall aus ipsilateraler Richtung und minimal bei Schall aus contralateraler Richtung (Abbildung 2).

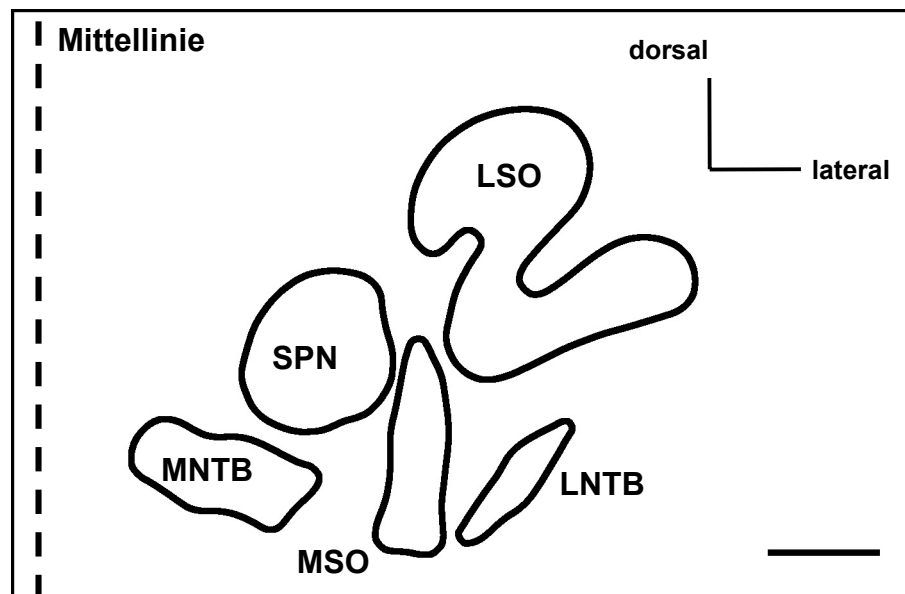
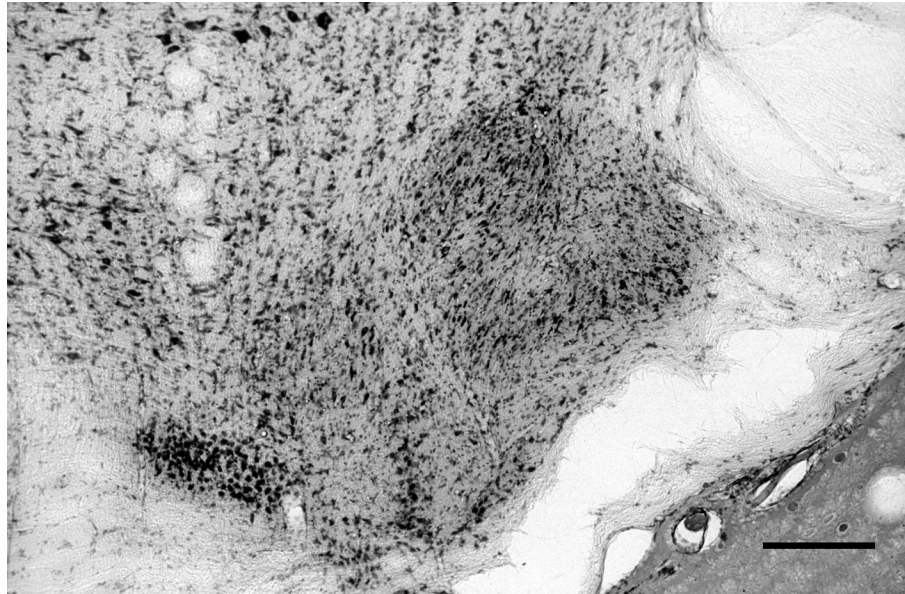


Abbildung 1 Darstellung einiger wichtiger Kerne des SOC einer Wüstenrennmaus

Nissl-Färbung der rechten Seite des auditorischen Hirnstamms einer Wüstenrennmaus. Zur besseren Erkennbarkeit sind die Kerne der Färbung um unteren Bild nachskizziert. Deutlich zu erkennen ist die S-förmige Struktur der LSO. Weiter medial bzw. ventral finden sich die in dorsoventraler Richtung angeordnete MSO, der SPN, der MNTB und lateral der MSO der LNTB. Abbildung leicht modifiziert nach (Seidl, 1999). Maßstab 200 μm .

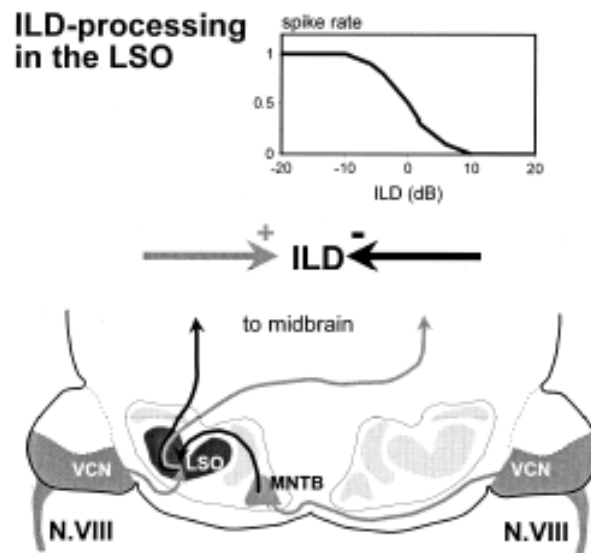


Abbildung 2 Funktionsweise der LSO

Die LSO erhält einen erregenden Eingang von ipsilateral und einen hemmenden Eingang von contralateral. Durch sich verändernden interaurale Intensitätsdifferenzen wirken beide Eingänge unterschiedlich auf das Antwortverhalten von LSO-Neuronen. Ist der erregende Eingang bei Schall aus der ipsilateralen Hemisphäre stärker als der hemmende Eingang, so kommt es zu einer hohen Feuerrate, und umgekehrt. Abbildung aus Grothe, 2000.

2.2.1 DIE MSO UND IHRE EINGÄNGE

Die MSO ist ein bilateraler Kern im auditorischen Hirnstamm der akustische Signale von beiden Ohren verarbeitet. Die MSO wurde erstmals von Ramon y Cajal (Ramon y Cajal, 1907) als Teil des SOC beschrieben. Die Zellpopulation der MSO setzt sich aus verschiedenen Neuronentypen zusammen. Die primären MSO Zellen (engl. principal cells) liegen beispielsweise bei der Katze (Abbildung 3) und auch in der Wüstenrennmaus in hoch geordneter Form vor. Die Zellen sind in einem sich von dorsal nach ventral erstreckenden Zellband angeordnet und haben orthogonal zur dorsoventralen Achse angeordnete bipolare Dendriten, die sich nach medial und lateral erstrecken (Ramon y Cajal, 1907; Stotler, 1953). Die MSO erhält binaurale erregende Eingänge von den sogenannten ‚spherical bushy cells‘ im VCN (Osen, 1969; Warr, 1972; Ryugo, 1992; Smith et al., 1993; Beckius et al., 1999). Die binauralen glyzinergen hemmenden Eingänge kommen vom LNTB der ipsilateralen Seite, der vom ipsilateralen Ohr getriebenen wird, und vom contralateralen Ohr getriebenen MNTB der ipsilateralen Seite (Abbildung 4; Katze: Clark, 1969; Perkins, 1973; Cant, 1991, Wüstenrennmaus: Cant and Hyson, 1992; Kuwabara and Zook, 1992). Die Existenz inhibitorischer Eingänge wurde durch physiologische Untersuchungen

(Goldberg and Brown, 1969; Grothe et al., 1997; Batra et al., 1997a; Grothe and Park, 1998) und durch die pharmakologische Blockade von Glyzin gestützt (Grothe et al., 1992; Grothe and Sanes, 1993; Grothe, 1994; Grothe and Sanes, 1994; Grothe, 1997).

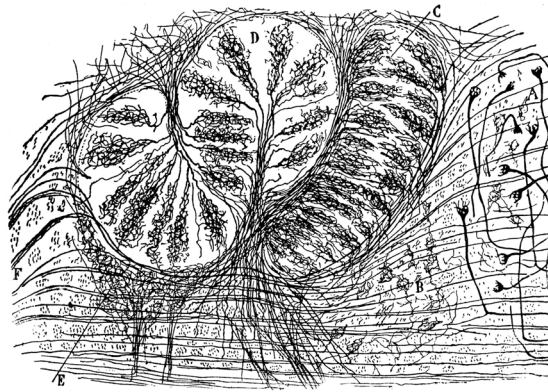
a

FIG. 344. — Ensemble des arborisations nerveuses des noyaux olivaires et trapézoïdes; chat âgé de quelques jours. Méthode de Golgi.

A, noyau du corps trapézoïde; — B, noyau préolivaire interne; — C, olive accessoire; — D, olive supérieure; — E, foyer semilunaire ou préolivaire externe; — F, fibres trapézoïdes.

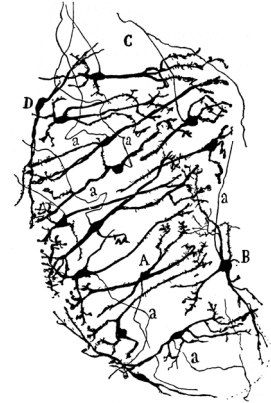
b

FIG. 345. — Cellules de l'olive supérieure accessoire; chat de 20 jours. Méthode de Golgi (d'après Lavilla).

A, cellules centrales; — B, neurones marginaux; — C, région profonde du foyer; — a, axone.

Abbildung 3 Anatomie der MSO nach Ramon y Cajal

a, LSO (links) und die MSO (rechts) der rechten Seite des SOC einer Katze. **b**, Golgi-gefärbte MSO-Zellen und die geordnete Orientierung der bipolaren Zellen. Deren Dendriten erstrecken sich nach medial bzw. lateral und die Zellen in der MSO sind regelmäßig übereinander aufgestapelt. Abbildung aus „History of the nervous system, Vol. I“ von Ramon y Cajal, © 1995 by Oxford University Press, Inc., siehe auch Grothe, 2000.

Die exzitatorischen Eingänge vom VCN zur MSO sind phasengekoppelt, d.h. die Aktionspotentiale sind synchronisiert zu jedem Zyklus der sinusförmigen Schallwelle eines Reintons (Abbildung 5). Die bereits im Hörnerv existente Phasenkopplung (Galambos and Davis, 1943; Kiang et al., 1965; Rose et al., 1967) wird durch die „spherical bushy cells“ im VCN verbessert (Joris et al., 1994a; Joris et al., 1994b) und an die MSO weitergegeben.

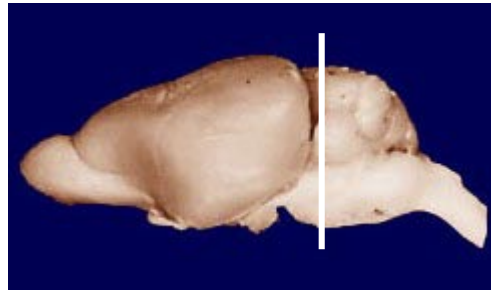
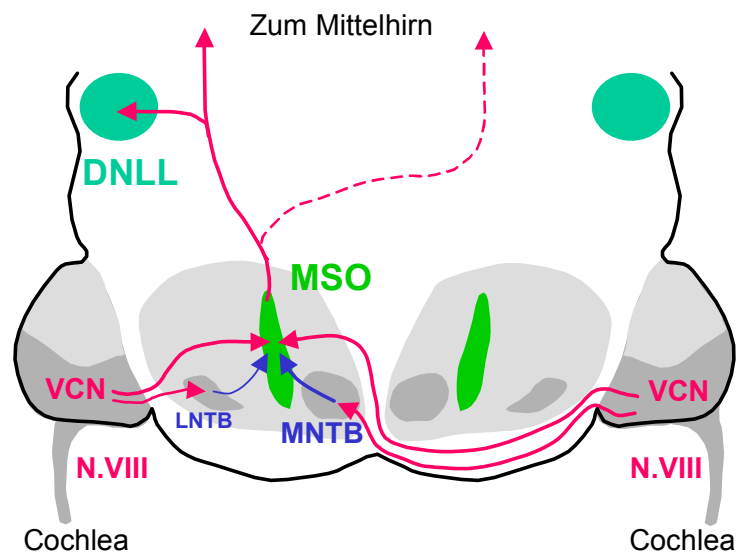
a**b**

Abbildung 4 Querschnitt des auditorischen Hirnstamms und Eingänge zur MSO

a, Ansicht des Gehirns einer Wüstenrennmaus von lateral. Von links nach rechts sind Bulbus olfactorius, Cortex, Cerebellum und darunter der Hirnstamm zu sehen. Zum rechten unteren Bildrand hin erstreckt sich das rostrale Ende des Rückenmarks. Die weiße Linie gibt die ungefähre Position des Querschnitts von **b** an. **b**, Schematischer Querschnitt des auditorischen Hirnstamms der Wüstenrennmaus. Die MSO erhält von beiden Seiten erregende Eingänge vom VCN und hemmende Eingänge vom ipsilateralen LNTB bzw. dem ipsilateralen MNTB. LNTB und MNTB bekommen ihrerseits erregende Eingänge vom ipsilateralen bzw. contralateralen VCN. Der DNLL erhält einen direkten erregenden Eingang von der MSO. Der dorsale Nucleus des lateralen Lemniscus (DNLL) erhält einen direkten erregenden Eingang von der ipsilateralen MSO. Bild in **a** von www.brainmuseum.org.

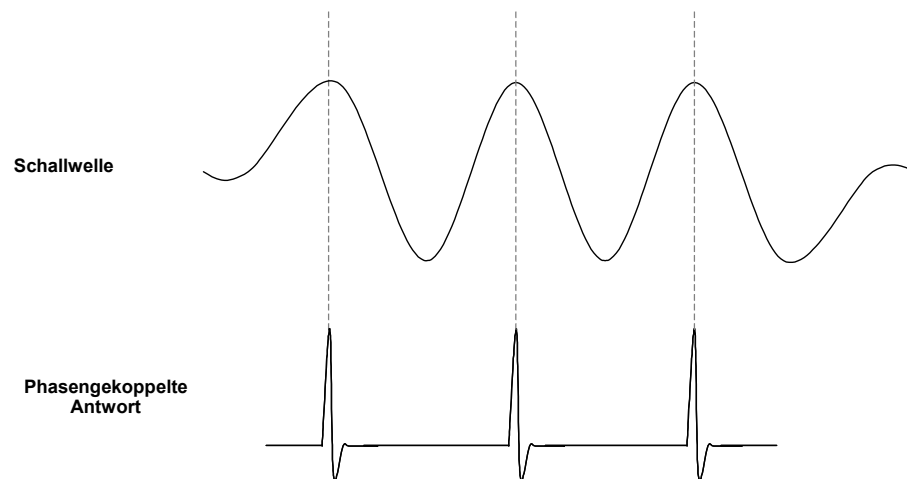


Abbildung 5 Phasengekoppelte Antwort

Ist die Antwort einer Zelle oder Phase phasengekoppelt, so tritt das Aktionspotential nur bei einem bestimmten Phasenwinkel des sinusförmigen Stimulus, hier der Schallwelle, auf.

Tieffrequente MSO Neurone zeigen ebenfalls phasengekoppelte Feuerraten bei der Stimulation mit tieffrequenten Tönen (Galambos et al., 1959; Goldberg and Brown, 1969; Crow et al., 1978; Yin and Chan, 1990; Spitzer and Semple, 1995; Batra et al., 1997a).

Die inhibitorischen Eingänge zur MSO weisen eine Spezialisierung für schnelle synaptische Übertragung auf (Smith et al., 1998; Spirou et al., 1998b; Taschenberger and von Gersdorff, 2000). Die MSO erhält hemmende Eingänge sowohl ipsilateral vom LNTB der gleichen Seite als auch von contralateral über den ipsilateralen MNTB (Abbildung 4). Der MNTB ist wahrscheinlich die Struktur mit der höchsten Konzentration des inhibitorischen Transmitters Glyzin im gesamten Gehirn (Wenthold et al., 1987). MNTB Neurone werden nur von einer einzigen Synapse pro Soma erregt (Ramon y Cajal, 1907; Morest, 1968), den sogenannten Calyxsynapsen, die durch ihre Struktur für die schnellste und sicherste Übertragung im gesamten Gehirn sorgen (Forsythe and Barnes-Davies, 1993; Brew and Forsythe, 1995). Tatsächlich sind MNTB Neurone sogar besser phasengekoppelt als die ‚globular bushy cells‘ des VCN (Smith et al., 1998). Somit sind die Neurone des MNTB in der Lage, die phasengekoppelte Antwort weiterzugeben (Smith et al., 1998). Das inhibitorische Ausgangssignal vom MNTB spiegelt das Zeitmuster des Schalls zeitlich sehr genau wider (vgl. Grothe, 2000) und ist ein bedeutender hemmender Eingang für verschiedene ipsilaterale Kernbereiche (LSO, MSO) des Hirnstamms.

Ein bedeutender Anteil der LNTB Neurone ist glyzinerg (Spirou and Berrebi, 1997) und erhält seine Eingänge wie der MNTB von den ‚globular bushy cells‘ des VCN. LNTB Neurone werden von großen synaptischen Terminalen innerviert (Spirou et al., 1998a), ähnlich den Eingängen zu VCN und MNTB, die sich durch eine schnelle synaptische Übertragung auszeichnen. Die morphologischen Ähnlichkeiten zwischen LNTB Zellen, den ‚globular cells‘ im VCN und MNTB Zellen lassen vermuten, dass diese Neurone auch funktionelle Attribute teilen. Tatsächlich wurde eine phasengekoppelte Antwort von LNTB Zellen *in vivo* beschrieben (Grothe and Park, 1998). Die physiologischen Eigenschaften von LNTB Zellen entsprachen *in vitro* (Grothe and Sanes, 1993; Grothe and Sanes, 1994) und *in vivo* (Grothe et al., 1997) grundsätzlich denen des MNTB.

Die auf die MSO treffenden inhibitorischen Projektionen sind also auf eine zeitlich präzise Übertragung spezialisiert und sind somit in der Lage, phasengekoppelte Signale weiterzugeben.

2.2.2 ITD-SENSITIVITÄT DER MSO

MSO Neurone haben mehrere physiologische Eigenschaften, die sie für die Verarbeitung von interauralen Zeitdifferenzen prädestinieren. Einzelzellableitungen von MSO Zellen in verschiedenen Säugetieren zeigen, dass ein großer Teil der Neurone von beiden Seiten einzeln erregbar ist (solche Zellen werden E/E Neurone genannt, ‚E‘ für ‚Excitation‘) (Katze: (Caird and Klinke, 1983; Yin and Chan, 1990); Hund: (Goldberg and Brown, 1969); Wüstenrennmaus: (Spitzer and Semple, 1995; Brand et al., 2002; Brand, 2003); free-tailed bats: (Grothe and Park, 1998).

Wie bereits erwähnt bekommt die MSO ihre exzitatorischen Eingänge von den ‚spherical bushy cells‘ des VCN. Diese Zellen verbessern die Phasenkopplung des Hörnervs und geben dieses phasengekoppelte Signal an die Neuronen der MSO weiter, die ihrerseits ebenfalls eine phasengekoppelte Antwort auf tieffrequente Tonstimuli zeigen (Galambos et al., 1959; Goldberg and Brown, 1969; Crow et al., 1978; Yin and Chan, 1990; Spitzer and Semple, 1995; Batra et al., 1997a).

Eine weitere wichtige Eigenschaft von MSO Neuronen ist die Selektivität für bestimmte ITDs. Abbildung 6 zeigt die ITD-Sensitivität einer MSO Zelle einer Katze. Die Zelle antwortet hier bei ungefähr +33 μ s, der sogenannten besten ITD, am besten,

d.h. mit der maximalen Feuerrate. Wird die interaurale Zeitdifferenz größer oder kleiner, so wird die Antwort schwächer.

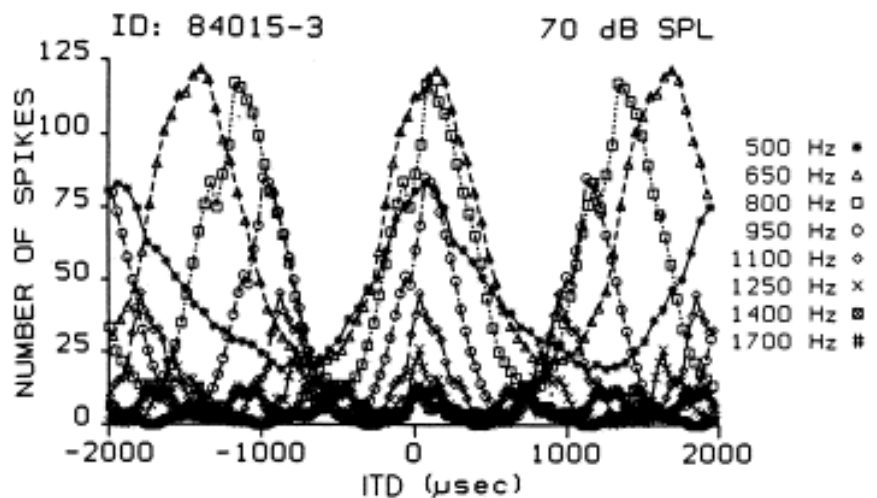


Abbildung 6 ITD-Sensitivität in der MSO der Katze

Das Diagramm zeigt ITD-Funktionen einer MSO-Zelle bei Reintönen von 500 bis 1700 Hz. Das Neuron antwortet am besten, unabhängig von der Frequenz, bei ca. + 33 µs, bei der sogenannten besten ITD. Die Höchstwerte links und rechts der besten ITD fallen nicht mehr übereinander, eine Folge der unterschiedlichen Wellenlängen der einzelnen Stimuli. Abbildung aus , Interaural time sensitivity in medial superior olive of cat', T. Yin und J.C. Chan, Journal of Neurophysiology, volume 64, August 1990 (Yin and Chan, 1990).

Wie der Stimulus, so ist auch die ITD-Funktion bei der Reizung mit einem tieffrequenten Reinton sinusförmig (siehe auch Abbildung 7). Verändert man die ITD von der besten ITD hin zu größeren Werten, so wird die Antwortrate erst kleiner, bevor sie wieder auf den maximalen Wert zu steigen beginnt, sie ist also zyklisch. Der Nachweis der Koinzidenzdetektorfunktion der MSO-Neurone wurde durch die Berechnung der besten ITD anhand der monauralen Periodenhistogramme erbracht (Yin and Chan, 1990). Eine ITD-sensitive Zelle antwortet am besten auf eine bestimmte Phase des monauralen Stimulus. Mit den Phasenverschiebungen von beiden monauralen Antworten lässt sich die theoretisch beste IPD der binauralen Antwort voraussagen und stimmt mit den durch binaurale Stimulation gewonnenen Ergebnissen überein (Goldberg and Brown, 1969; Yin and Chan, 1990; Spitzer and Semple, 1995; Grothe and Park, 1998). Außerdem war die maximale binaurale Antwort der Zellen größer als die Summe der monauralen Antworten. Dieser Vergleich der monauralen und binauralen Antworten deutet an, dass es zu einer Hemmung von weniger bevorzugten ITDs und einer Verstärkung von bevorzugten ITDs kommt (Yin and Chan,

1990). Das Prinzip der Koinzidenzdetektion ist in Abbildung 7 dargestellt. Die ITDs sind hier als interaurale Phasendifferenzen (IPDs) aufgetragen. Dabei wird die ITD auf die Frequenz des sinusförmigen Stimulus ‚normalisiert‘. Per Definition ist die IPD die ITD in Sekunden mal der Frequenz in Hertz, die Einheit wird in Zyklen oder Winkelgraden angegeben.

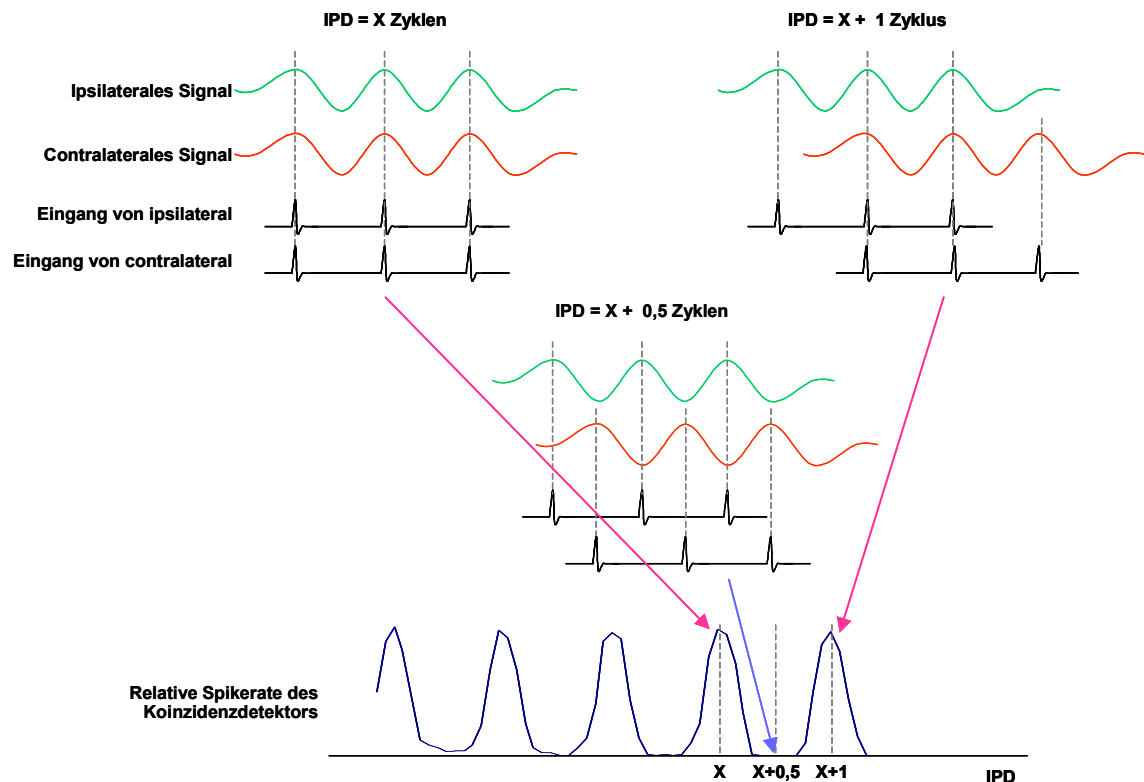


Abbildung 7 Prinzip der Koinzidenzdetektion in der MSO

Die Antworten beider Eingänge zur MSO sind phasengekoppelt zu dem akustischen Stimulus, der auf das Ohr auftrifft. Kommen diese beiden Signale mit einer bestimmten IPD (im Beispiel ist die sogenannte beste IPD gleich 0) an, so überlagern sich die Aktionspotentiale beider Eingänge und es kommt zur maximalen Antwort der Zelle (linkes Szenario). Werden die Stimuli um 180° oder um einen halben Zyklus verschoben, so feuern die erregenden Eingänge mit dem größtmöglichen zeitlichen Abstand, es kommt zur minimalen Antwort der Zelle (mittleres Szenario). Die Antwortrate liegt unterhalb der monauralen Antwort, d.h. wird für diese weniger bevorzugte ITD unterdrückt. Werden die Stimuli zeitlich weiter gegeneinander verschoben, so überlagert sich der sinusoidale Stimulus erneut und es kommt wiederum zur maximalen Antwort der Zelle (rechtes Szenario). Die Zelle zeigt ein zyklisches Antwortverhalten, d.h. solange sich die Stimuli zeitlich überlagern, kann es bei einer bestimmten IPD auch zu einer Koinzidenz der beiden erregenden Signale kommen. (Die abgebildete ITD-Funktion wurde tatsächlich im DNLL abgeleitet.)

Werden die beiden Stimuli von der besten IPD ausgehend verschoben, so entfernen sich die beiden erregenden Eingangssignale zeitlich voneinander, die Antwortrate der Zelle sinkt. Bei weiterem Verschieben der Stimuli überlagern sich die wellenförmigen

Reizsignale wieder und die phasengekoppelten Antworten der beiden Eingänge treffen zeitgleich auf die Zelle auf, es kommt zur maximalen Entladung.

Die beste ITD, also die ITD bei der die Zelle die stärkste Antwort zeigt, ist unabhängig von der Stimulusfrequenz (Abbildung 6). Die minimale Antwort, der sogenannte ‚Trough‘ (engl. für ‚Tiefpunkt‘) ändert sich jedoch in Abhängigkeit von der Frequenz. Die frequenzunabhängige ITD der maximalen Feuerrate ist definiert als die charakteristische Verzögerung (engl. characteristic delay, CD). Die CD kann in einem Phasen-Frequenz Plot (Abbildung 8) ermittelt werden, den man durch Auftragen der besten IPDs einer Zelle bei verschiedenen Stimulusfrequenzen als Funktion der Frequenz erhält.

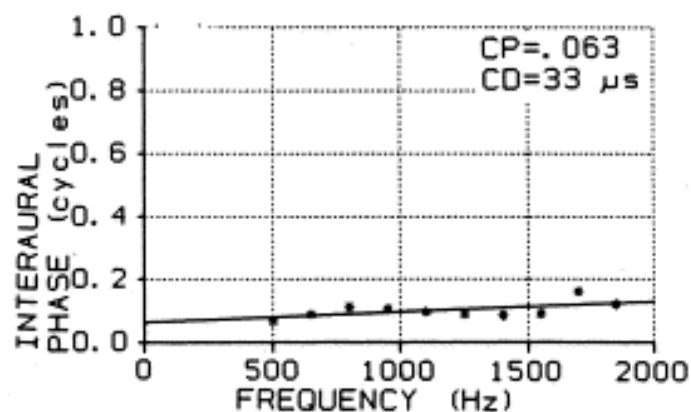


Abbildung 8 Phasen-Frequenz-Darstellung

In dem Diagramm sind die besten IPDs der MSO-Zelle von Abbildung 6 als Funktion der Frequenz aufgetragen. Der Schnittpunkt der Angleichungsgeraden mit der Y-Achse gibt die charakteristische Phase (CP) an. Die Steigung der Angleichungsfunktion ist die charakteristische Verzögerung (engl. characteristic delay, CD). Abbildung aus ‚Interaural time sensitivity in medial superior olive of cat‘, T. Yin und J.C. Chan, Journal of Neurophysiology, volume 64, August 1990 (Yin and Chan, 1990).

In dem Diagramm sind auf der X-Achse die Stimulationsfrequenzen und auf der Y-Achse die besten IPDs aufgetragen. Der Schnittpunkt der Anpassungsfunktion des Phasen-Frequenz-Plots mit der Ordinate gibt den Wert der charakteristischen Phase (CP) an. Die CP dient als Anhaltspunkt dafür, ob eine tieffrequente Zelle über verschiedene Frequenzen ihre maximale Entladung bei konstanter ITD (‚peak-type‘), oder ihre minimale Entladung bei einer konstanten zeitlichen Verzögerung (‚trough-type‘) hat. Die Definitionen für ‚peaker‘ und ‚trougher‘ sind in der Literatur klar

definiert: Neurone mit CPs um 0 sind ‚peak-type‘, und solche mit einer CP um 0,5 sind ‚trough-type‘ (Yin and Kuwada, 1983; Yin and Chan, 1990; Spitzer and Semple, 1995; Batra et al., 1997a; Fitzpatrick et al., 2000). ‚Peak-type‘ Neurone sind Koinzidenzdetektoren und bekommen einen binauralen exzitatorischen Eingang (E/E), während eine ‚trough-type‘ Antwort durch die Interaktion eines exzitatorischen und einen inhibitorischen Eingang (E/I) zustande kommt. Weniger Übereinstimmung gibt es allerdings bei der Beurteilung der Mischformen. Fitzpatrick et al. bezeichnen Neurone mit einer CP von 0,25 als ‚intermediate‘ (Fitzpatrick et al., 2000), wohingegen bei Fitzpatrick und Kuwada ‚peaker‘ eine CP von 0 bis 0,25 und ‚trougher‘ eine CP von 0,25 bis 0,5 haben (Fitzpatrick and Kuwada, 2001). Während ‚peak-type‘ Antworten ihren Ursprung in der MSO haben (Yin and Chan, 1990; Spitzer and Semple, 1995; Batra et al., 1997a), entstehen ‚trough-type‘ Antworten in der LSO (Rose et al., 1966; Yin and Kuwada, 1983; Batra et al., 1993; Joris, 1996; Kuwada et al., 1997; Batra et al., 1997a). Durch die E/I-Eigenschaften der Zellen kommt es bei einer Koinzidenz von beiden Eingängen zur maximalen Hemmung, also zu einer minimalen Antwort.

2.3 KODIERUNG VON INTERAURALEN ZEITDIFFERENZEN

1948 schlug Jeffress ein Modell vor, mit dem interaurale Zeitdifferenzen kodiert werden können (Jeffress, 1948). Dieses Modell beschreibt die Abbildung von unterschiedlichen ITDs durch eine neuronale Ortskarte. Bei bestimmten ITDs antworten bestimmte Neurone maximal und informieren damit höhere Gehirnzentren über die Lage der Schallquelle. Das Prinzip dieses Modells basiert auf der Kompensation unterschiedlicher Ankunftszeiten des Schalls an beiden Ohren mit unterschiedlich langen axonalen Verzögerungsketten (sogenannten ‚delay lines‘), die auf die als Koinzidenzdetektor arbeitenden Neurone treffen (Abbildung 9).

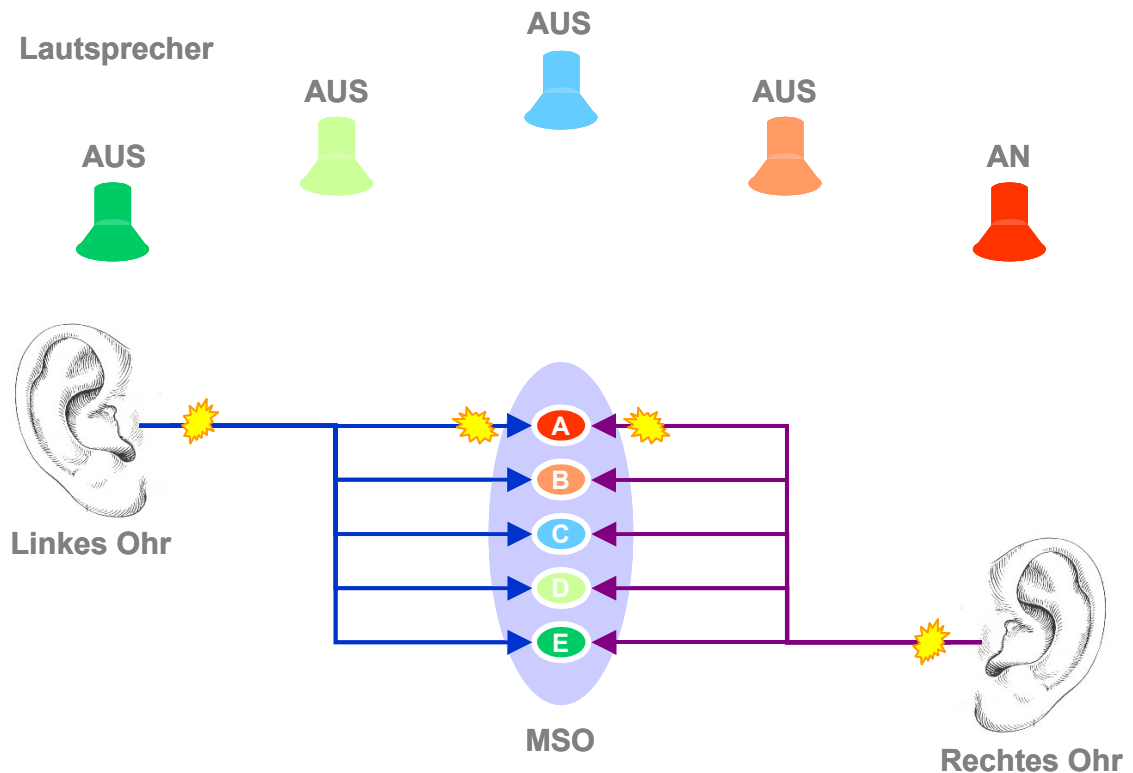


Abbildung 9 Jeffress Modell der ITD-Verarbeitung

Beim Jeffress Modell werden die unterschiedlichen Laufzeiten des Schalls zu beiden Ohren durch axonale Verzögerungsketten kompensiert. Somit kodieren die als Koinzidenzdetektoren arbeitenden Neurone verschiedene ITDs im Azimuth. Im abgebildeten Beispiel werden die unterschiedlichen Ankunftszeiten von Schall aus dem roten Lautsprecher durch die axonalen Verzögerungsketten so ausgeglichen, dass beide Signale bei Neuron A gleichzeitig auftreffen. Kommt der Schall direkt von vorne (blauer Lautsprecher), so antwortet Neuron C.

Tatsächlich treffen für die MSO viele Annahmen des Jeffress Modells zu: Die Anordnung der Zellen innerhalb des Nukleus, ihre phasengekoppelten exzitatorischen Eingänge und die Funktion als Koinzidenzdetektor passen gut zu dem 1948 vorgeschlagenen Modell. Eine ausführliche Beschreibung des klassischen Bildes der MSO ist in den Übersichtsartikeln von Benedikt Grothe nachzulesen (Grothe, 2000; Grothe, 2003).

Obwohl die MSO einige Voraussetzungen für eine Funktion nach dem Jeffress Modell erfüllt, so gibt es doch nur wenige Ergebnisse, die auf die Existenz von Verzögerungsketten oder einer Ortskarte schließen lassen. Nur zwei Studien geben Hinweise für die Existenz von ‚delay lines‘ (Smith et al., 1993; Beckius et al., 1999), wobei in beiden Fällen keine systematische Anordnung von axonalen Verzögerungsketten gezeigt werden kann. In der Studie von Smith et al. (Smith et al., 1993) zeigten nur weniger als ein Fünftel der Zellen Anhaltspunkte für

Verzögerungsketten, also die Projektionen zu einem Großteil der Zellen passten nicht zum Konzept der ‚delay lines‘. Für die von Jeffress postulierte Ortskarte gibt es für die MSO nur schwache Evidenzen (Yin and Chan, 1990) und es bleibt außerdem unklar, warum eine Karte von besten ITDs in der nächsthöheren Ebene, dem Colliculus inferior (IC), bislang nicht gefunden wurde (Oliver et al., 2003).

Außerdem wurden in einer Reihe von Studien in verschiedenen Tieren ITD-Funktionen gefunden, die ihre beste ITD bei Stimulation mit der Bestfrequenz außerhalb des physiologischen Bereiches hatten (Batra et al., 1997b; Fitzpatrick et al., 2000; McAlpine et al., 2001; Brand et al., 2002). Im IC des Meerschweinchens (McAlpine et al., 2001) (Abbildung 10) und in der MSO der Wüstenrennmaus (Brand et al., 2002) waren sogar die Maxima der meisten ITD-Funktionen außerhalb des physiologischen Bereiches.

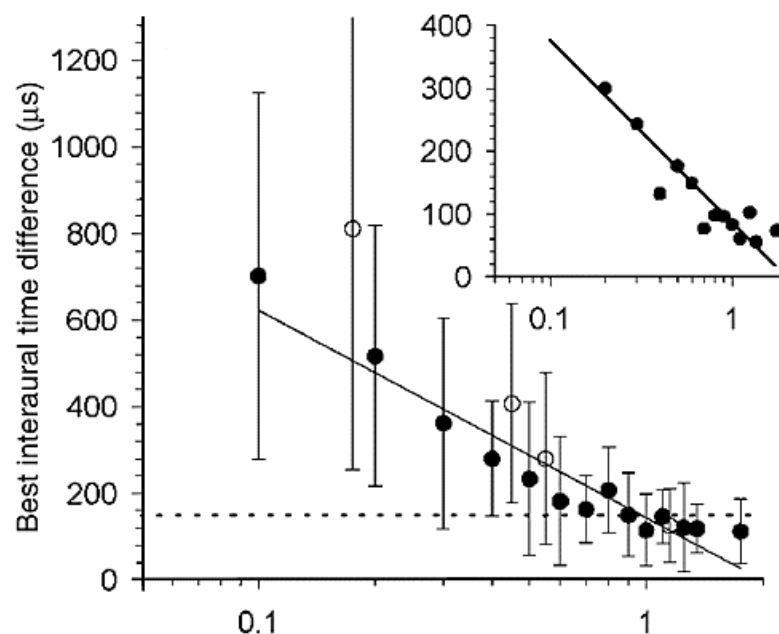


Abbildung 10 Beste ITDs als Funktion der Frequenz beim Meerschweinchen

Verteilung der besten ITDs in Abhängigkeit zur Stimulusfrequenz. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den physiologisch relevanten Bereich für ITDs beim Meerschweinchen. Mit abnehmender Stimulusfrequenz nimmt die beste ITD zu. Die meisten besten ITDs liegen außerhalb des physiologischen Bereiches. Innerhalb des physiologischen Bereiches gibt es keine systematische Verteilung von besten ITDs. Das Insert zeigt die Standardabweichungen in Abhängigkeit von der Frequenz. Abbildung aus (McAlpine et al., 2001).

In keiner dieser beiden Studien wurde eine systematische Verteilung der ITD-Funktionen über den physiologischen Bereich gefunden. Vielmehr scheinen die besten

ITDs von Zellen mit der gleichen Bestfrequenz (BF, die Frequenz bei der die Zelle höchste Sensitivität zeigt) um einen konstanten Wert angeordnet zu sein. ITD-Funktionen bei einer hohen BF bevorzugen kurze ITDs, die mit tiefen BFs längere ITDs (Abbildung 10). Über alle gemessenen Frequenzen stellt sich damit eine Abhängigkeit für die beste IPD um einen konstanten Wert ein (MSO Wüstenrennmaus: 0,12 Zyklen (Brand et al., 2002); IC Meerschweinchen: 0,125 Zyklen (McAlpine et al., 2001); Katze: 0,2 Zyklen (Hancock and Delgutte, 2003). Durch diese Abhängigkeit der besten ITD von der Frequenz sind ITD-Funktionen so abgestimmt, dass die maximale Steigung der ITD-Funktion nahe 0 ITD liegt (Abbildung 11). Die Abstimmung der maximalen Steigungen um 0 ITD stellt eine biophysikalische Basis für die Kodierung von interauralen Zeitdifferenzen dar (Skottun et al., 2001).

ITDs scheinen also nicht durch die maximale Aktivität von einzelnen Neuronen entschlüsselt zu werden. Vielmehr ist wohl das Maß der Aktivität von vielen Neuronen verantwortlich für die Kodierung von interauralen Zeitdifferenzen. Tatsächlich sind vielleicht nur sehr wenige Neurone nötig, um die Lage einer Schallquelle zu bestimmen (Skottun, 1998).

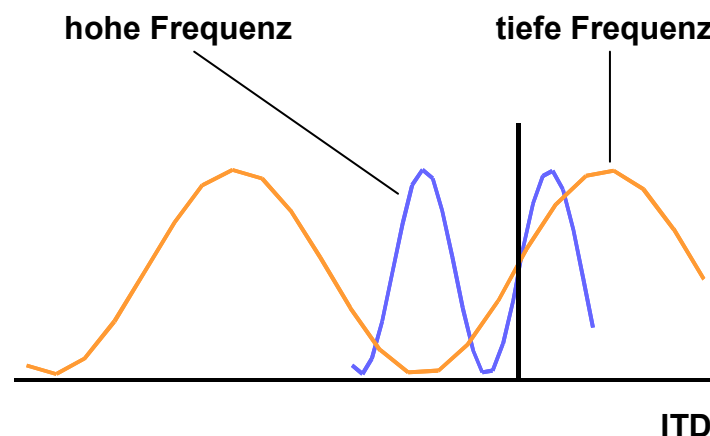


Abbildung 11 Anpassung der maximalen Steigung

Werden ITD-Funktionen so abgestimmt dass die besten ITDs bei niedriger Stimulusfrequenz größer sind, so kommt es zu einer systematischen Abstimmung der maximalen Steigung auf 0 ITD.

Das Jeffress Modell berücksichtigt die inhibitorischen Eingänge zur MSO nicht. Die zeitlich präzisen Übertragungseigenschaften dieser Eingänge (Spirou et al., 1998c; Taschenberger and von Gersdorff, 2000) und die räumliche Segregation bei ITD-

verarbeitenden Tieren (Clark and Dunlop, 1969; Perkins, 1973) deuten jedoch auf eine spezifische Rolle der hemmenden Eingänge hin.

Überlegungen zur Rolle der Inhibition bezüglich der ITD-Detektion gab es bereits 1969 durch Clark (Clark, 1969). Spezifisch wurde die Rolle der inhibitorischen Eingänge zur MSO in bezug auf die ITD-Kodierung erstmals mit einem Modell untersucht (Batra et al., 1997a). Damit kann durch eine phasengekoppelte Inhibition vom MNTB die Abstimmung der ITD-Funktionen auf eine bestimmte beste IPD erklärt werden. Tatsächlich wurde erst vor kurzem die Wirkungsweise der Inhibition direkt gezeigt. Brand und Kollegen (Brand et al., 2002) blockierten *in vivo* durch die elektrophoretische Applikation von Strychnin die glyzinerge Transmission in der MSO der Wüstenrennmaus und konnten dadurch den Einfluss der Inhibition auf die ITD-Funktion untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass die erregenden Eingänge alleine eine ITD-Sensitivität um 0 ITD ausbilden und erst die Inhibition die ITD-Funktion so abstimmt, dass sich die besten IPDs um 0,12 Zyklen anordnen (Abbildung 12).

Durch die systematische Abstimmung der besten IPDs ordnen sich die maximalen Steigungen der ITD-Funktionen unabhängig von der Stimulusfrequenz auf eine ITD nahe 0 an, also bei ITDs bei denen die Fähigkeit zur Schalllokalisation am besten ausgeprägt ist (Makous and Middlebrooks, 1990). Das Fehlen einer systematischen Anordnung der besten ITDs innerhalb des physiologischen Bereiches ($\pm 120 \mu\text{s}$ bei der Wüstenrennmaus; Maki et al., 2003) und die stattdessen erfolgende systematische Abstimmung der maximalen Steigungen um 0 ITD, deutet darauf hin, dass ITDs wahrscheinlich nicht nach dem Prinzip des Jeffress Modells kodiert werden. Demzufolge werden verschiedene ITDs bereits auf der Ebene von einzelnen Zellen durch eine unterschiedliche Feuerrate verschlüsselt. Stimuli von der contralateralen Hemisphäre werden mit hohen Antwortraten, die von der ipsilateralen Hemisphäre mit niedrigen Spikeraten kodiert. Die inhibitorischen Eingänge zur MSO sind dabei verantwortlich für die genaue Abstimmung der ITD-Sensitivität auf den physiologisch relevanten Bereich (Grothe, 2003; McAlpine and Grothe, 2003).

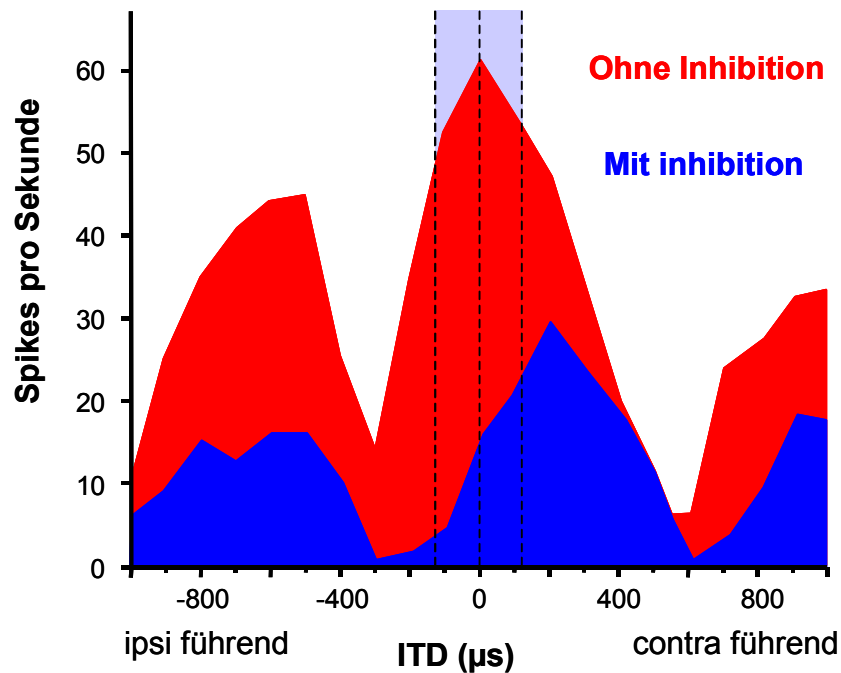


Abbildung 12 Verschiebung der ITD-Funktion bei Blockade der Inhibition

Die blaue Kurve zeigt die ITD-Funktion einer MSO-Zelle unter Kontrollbedingungen *in vivo*. Die beste ITD liegt außerhalb des physiologischen Bereiches (blauer Balken) und die maximale Steigung der Funktion liegt nahe 0. Wird der inhibitorische Transmitter Glyzin durch Applikation von Strychnin blockiert, liegt die beste ITD um 0 und die maximale Steigung außerhalb des physiologischen Bereiches. Abbildung modifiziert aus (Brand et al., 2002).

2.4 ONTOGENIE DER INHIBITORISCHEN EINGÄNGE ZUR MSO

Die physiologische Natur und die Wirkungsweise der Inhibition wurde in den vorangehenden Kapiteln dargelegt. Ein weiteres wichtiges Phänomen der hemmenden Eingänge ist ihre räumliche Anordnung an den MSO-Zellen. Bereits 1969 zeigte Clark bei der MSO der Katze, dass die inhibitorischen Synapsen auf den Zellkörper beschränkt sind (Clark, 1969). Perkins zeigte die Restriktion von inhibitorischen Synapsen auf das Soma von MSO-Neuronen 1973 für den Chinchilla (Perkins, 1973). Beide Tiere haben ein gut ausgeprägtes Hörvermögen im tieffrequenten Bereich und ihre MSO zeigt eine hohe Auflösung von ITDs (Clark and Dunlop, 1969; Langford, 1984). Erste Arbeiten aus unserem Labor zeigten eine solche Restriktion der inhibitorischen glyzinerger Synapsen an der MSO der Wüstenrennmaus (Seidl, 1999; Kapfer et al., 2002). Die Entwicklung hin zu einer Restriktion der Synapsen auf das Soma von MSO-Zellen findet in der Wüstenrennmaus erst nach Hörbeginn statt (Seidl, 1999; Kapfer et al., 2002). In zehn Tage alten Wüstenrennmäusen, zwei Tage vor

Hörbeginn dieser Tiere, findet man glyzinerge Eingänge gleichmäßig verteilt über Soma und proximale sowie distale Dendriten (Seidl, 1999; Kapfer et al., 2002). Eine höchstens 15 Tage lange Periode ist ausreichend um diese Entwicklung abzuschließen. Die Restriktion der inhibitorischen Synapsen auf das Soma unterbleibt, wenn einer der binauralen Eingänge denerviert wird (Kapfer, 1999; Kapfer et al., 2002).

2.5 ARBEITSHYPOTHESEN UND FRAGESTELLUNGEN

Zusammenfassend ergeben sich aus den bis dato gefundenen Ergebnissen verschiedene Schlussfolgerungen:

1. Die glyzinerge Inhibition an der MSO stimmt die ITD-Funktionen so ab, dass sich die maximalen Antworten um eine bestimmte IPD anordnen.
2. Im Gegensatz zu Tieren vor Hörbeginn, sind die glyzinerger Projektionen sind in der adulten Wüstenrennmaus auf die Somata von MSO-Neuronen beschränkt.
3. Das Ausschalten von binauraler Aktivität zur MSO blockiert die Restriktion der inhibitorischen Synapsen nach Hörbeginn.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ergaben sich direkt nun folgende Ansätze, die zu den unterschiedlichen Projekten dieser Arbeit führten.

2.5.1 ERFAHRUNGSABHÄNGIGE PLASTIZITÄT GLYZINERGER SYNAPSEN AN MSO NEURONEN

Zunächst sollte geklärt werden, ob die gefundene Restriktion von glyzinerger Synapsen an MSO-Zellen der Wüstenrennmaus erfahrungsabhängig ist. Das Entfernen einer Cochlea nimmt dem akustischen Stammhirn zwar einen seiner binauralen Eingänge, bedeutet aber gleichzeitig einen massiven Eingriff in das gesamte System. Die Entfernung einer Cochlea führt zu Zelltod im contralateralen MTNB (Russell and Moore, 1995) und 58% der Neurone im AVCN sterben innerhalb von zwei Wochen nach der Entfernung einer Cochlea bei einem sieben Tage alten Gerbil (Hashisaki and Rubel, 1989). Das Herausnehmen einer Cochlea führt also zu starken Veränderungen im SOC. Das Entfernen einer Cochlea eignet sich nicht zur Beantwortung der Frage, ob

die Restriktion der inhibitorischen Eingänge auf das Zellsoma tatsächlich auf den Einfluss binauraler Hörerfahrung zurückzuführen ist.

Idealerweise müßte man die Tiere in der kritischen Periode von Tag 10 bis Tag 25 nach der Geburt (P10 bis P25, ‚P‘ für ‚postnatal‘) gänzlich ohne akustische Erfahrung, also in absoluter Stille, aufwachsen lassen. Da die Tiere aber selbst Lärm verursachen und außerdem im Alter von zehn Tagen noch von der Mutter gesäugt werden, ist dieser Ansatz so nicht durchführbar. Withington-Wray et al. haben dieses Problem mit der Maskierung von räumlicher akustischer Information durch omnidirektionales weißes Rauschen umgangen (Withington et al., 1990; Withington-Wray et al., 1990). Um den Einfluss von akustischer Erfahrung auf die Raumkarte im oberen Colliculus (engl. superior colliculus, SC) zu untersuchen, wurden Meerschweinchen für eine bestimmte Zeit in einer schallisolierten Kammer gehalten und omnidirektionalem Rauschen ausgesetzt. Tatsächlich veränderte sich durch Manipulation der Hörerfahrung durch omnidirektionales Rauschen während einer kritischen Phase die grobe auditorische Raumkarte im SC (Withington et al., 1990).

Die Hypothese für die folgenden Versuche war, dass die Entwicklung hin zu einer Beschränkung der glyzinerger Synapsen auf das Soma abhängig ist von räumlicher akustischer Erfahrung kurz nach Hörbeginn. Wird die Hörerfahrung durch omnidirektionales Rauschen maskiert, so unterbleibt diese Entwicklung.

Das omnidirektionale weiße Rauschen von allen sechs Seiten verursacht das Auftreten von allen nur möglichen ITDs über alle Frequenzen, so dass sämtliche natürlich vorkommende räumliche akustische Signale überlagert werden.

Der Ansatz in dem ersten Teil dieser Arbeit war es die Methode zur akustischen Deprivation nach Withington-Wray et al. in modifizierter Form zu übernehmen und zu überprüfen, welchen Einfluss omnidirektionales weißes Rauschen auf die Entwicklung der Verteilung der glyzinerger Synapsen hat. Dazu wurden Wüstenrennmäuse während der kritischen Periode von P10 bis P25 in der unter 3.2 beschriebenen ‚NoiseBox‘ aufgezogen, und anschließend die Verteilung von inhibitorischen Synapsen an MSO Zellen mit der von juvenilen und adulten Wüstenrennmäusen mittels Doppelfärbung gegen Dendriten und Glyzinrezeptoren zu vergleichen.

2.5.2 ENTWICKLUNG DER ITD-SENSITIVITÄT NACH HÖRBEGINN

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand darin, die Entwicklung der ITD-Sensitivität nach Hörbeginn und deren Abhängigkeit von räumlicher akustischer Erfahrung zu untersuchen. Die Fragestellung vor diesen Versuchen war: gibt es eine Entwicklung der ITD-Sensitivität nach Hörbeginn? Ist diese Entwicklung abhängig von relevanter akustischer Erfahrung und korreliert diese Entwicklung mit der Verteilung der inhibitorischen Eingänge an MSO-Neuronen?

Zu diesem Zweck wurden ITD Funktionen bei verschiedenen Tiergruppen gemessen: in Tieren kurz nach Hörbeginn, in Jungtieren mit experimentell veränderter Hörerfahrung, in normalen adulten Tieren und in Tieren, die für einen begrenzten Zeitraum nach Hörbeginn dem omnidirektionalen Rauschen ausgesetzt waren. Die ITD-Funktionen wurden im DNLL gemessen, da Ableitungen in der MSO wiederholt als sehr schwierig beschrieben wurden (Goldberg and Brown, 1969; Yin and Chan, 1990; Spitzer and Semple, 1995). Die Etablierung der Einzelzellableitung im DNLL war ein weiterer wichtiger Bestandteil dieser Arbeit.

2.5.3 FEHLENDE PLASTIZITÄT INHIBITORISCHER EINGÄNGE IN DER MSO DER RATTE

Ist die Restriktion der inhibitorischen Eingänge auf das Soma von MSO-Neuronen eine spezifische Anpassung an die Verarbeitung von interauralen Zeitdifferenzen, so sollte man diese Beschränkung bei Tieren, die keine ITDs zur Schalllokalisation benutzen, nicht finden. Erste Versuche an der MSO von Ratte und Opossum – Tieren, die tiefe Frequenzen unter 2 kHz nur schlecht wahrnehmen – zeigten, dass es dort zu keiner Restriktion der inhibitorischen Eingänge auf das Soma von MSO-Zellen kommt (Kapfer, 1999). Folglich handelt es sich bei der räumlichen Verteilung der hemmenden Eingänge um ein strukturelles Korrelat einer funktionellen Anpassung.

Der dritte Teil dieser Arbeit bestand darin, die Verteilung von glyzinergen Synapsen an MSO Zellen in der adulten Ratte sowohl qualitativ mit Doppelfärbung zu untersuchen, als auch quantitativ mit der Synapsenverteilung von juvenilen Ratten vor Hörbeginn zu vergleichen.

3 MATERIAL UND METHODEN

Methodisch gliedert sich die vorliegende Arbeit im wesentlichen in einen immunohistochemischen Teil, der DAB-Einfachfärbungen, Fluoreszenz-Doppelfärbungen und Färbungen für Elektronenmikroskopie umfasst, sowie einen elektrophysiologischen Teil, der die Einzelzellableitungen im DNLL beinhaltet.

Alle aufgeführten Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.1 VERSUCHSTIERE

3.1.1 DIE MONGOLISCHE WÜSTENRENNMAUS, *MERIONES UNGUICULATUS*

Die Wüstenrennmaus, auch Gerbil genannt, hat ein sehr ausgeprägtes Hörvermögen im tieffrequenten Bereich, benützt ITDs zur Schallokalisation (Heffner and Heffner, 1988; Spitzer and Semple, 1995) und besitzt eine gut ausgeprägte MSO (Kapfer, 1999; Seidl, 1999). Der Gerbil eignet sich deshalb gut für Entwicklungsstudien, da das Hörvermögen erst 12 Tage nach der Geburt einsetzt.

3.1.2 DIE RATTE, *RATTUS NORWEGICUS*

Die Ratte besitzt im Gegensatz zur Wüstenrennmaus kein gutes Hörvermögen im tieffrequenten Bereich (Kelly and Masterton, 1977) und diente in dieser Studie als Modell für ein Tier, das keine interauralen Zeitdifferenzen zur Lokalisation von Reintönen verarbeitet. Es wurden Sprague-Dawley und Wistar Albinoratten benützt.

3.2 NOISEBOX

Hauptziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von räumlicher akustischer Erfahrung auf die Entwicklung von ITD-Verrechnung zu bestimmen. Aufgrund früherer Versuche konnte eine für die binaurale Erfahrung kritische Periode festgelegt werden (Kapfer, 1999; Seidl, 1999). Diese Periode beschränkt sich bei der Wüstenrennmaus maximal auf den Zeitraum ab Hörbeginn (P12) bis zum adulten Zustand des Hörsystems in der Wüstenrennmaus (P25).

Das Konzept unserer Noisebox (Abbildung 14) basiert auf einer von Withington-Wray et al. konzipierten Kammer (Withington-Wray, 1990a). Unsere Kammer hat die Maße 100 x 80 x 80 cm und ist durch einen schalldämmenden Schaumstoff (illbruck pyramide, Illbruck, Leverkusen) isoliert. An jeder der sechs Seiten sind jeweils zwei Hochtöner und zwei Tieftöner angebracht (TW 6NG, Visaton, Haan, Deutschland bzw. Philips Breitband Lautsprecher BN 201 434, bezogen über Sintron, Iffezheim). Jeweils ein Hoch- und Tieftöner pro Seite wurden durch eine Frequenzweiche (Eigenbau) zusammengeschlossen und mit einem Lautsprecherpaar von jeder der anderen Seiten verbunden. Jede der so in Reihe geschalteten Lautsprechereinheiten wurde von einem analogen Rauschgenerator (Rauschgenerator 30Hz - 6 MHz, Type SUF BN 4150, Rhode & Schwarz, München), über einen Verstärker (Natural Sound Stereo Amplifier A 460, YAMAHA, Rellingen) angetrieben. Das Frequenzspektrum des Hochtöners deckte den Bereich von 3500 Hz bis 30 kHz ab, der Tieftöner hatte einen Frequenzbereich von 100 Hz bis 12 KHz. Durch jede der Lautsprechereinheiten wurde so ein weißes Rauschen von allen sechs Seiten synchron auf das Kammerinnere abgegeben. Damit überlagerten sich zwei verschieden generierte Rauschen in der Kammer.

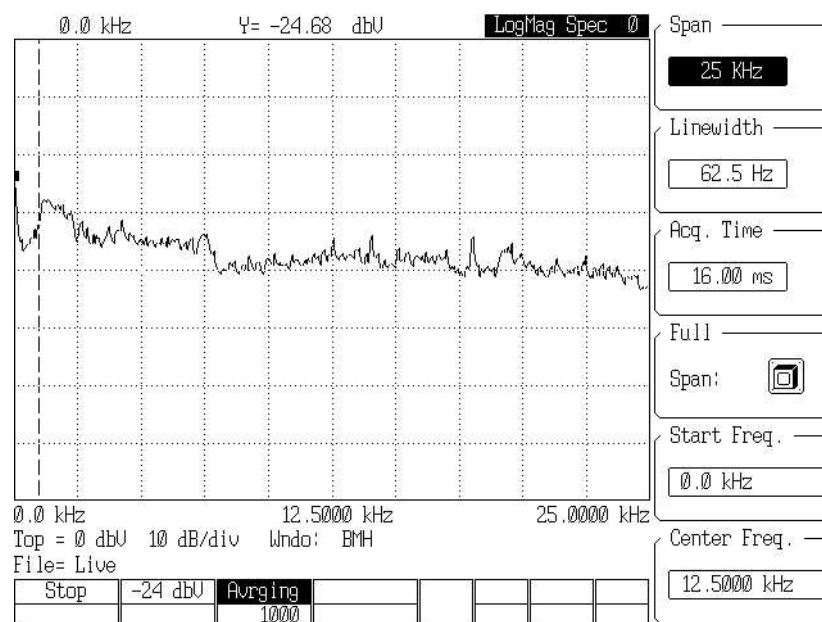


Abbildung 13 Frequenzgang im Inneren der Noisebox

Hier ist der Frequenzgang in der Noisebox von 0 bis 25 kHz bei Versuchsbedingungen dargestellt. Im Bereich bis 20 kHz ist der Frequenzgang relativ stabil, d.h. die verschiedenen Frequenzen sind in dem weißen Rauschen gleichmäßig repräsentiert.

In Abbildung 13 ist der Frequenzgang in der Noisebox abgebildet. Im Bereich 0 bis 20 kHz ist der Frequenzgang relativ stabil. Das weiße Rauschen enthielt somit alle Frequenzen bei etwa gleicher Lautstärke.

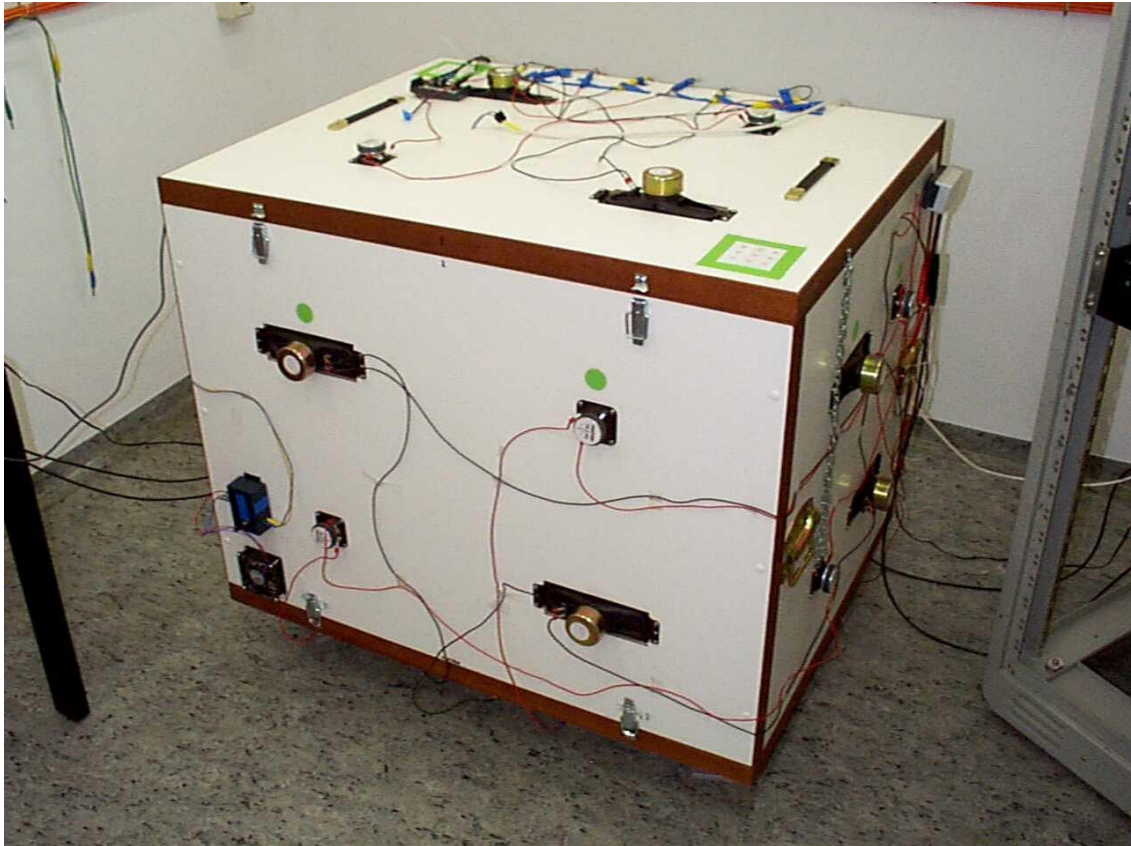


Abbildung 14 Noisebox in geschlossenem Zustand

Deutlich zu erkennen sind die jeweils vier Lautsprecher pro Seite, zwei Hoch- und zwei Tieftöner, die in Paaren von einem Rauschgenerator betrieben wurden. In der linken unteren Ecke ist einer der beiden Lüfter zu sehen, der die Abluft aktiv nach Außen befördert. Frische Luft strömte gefiltert durch zwei Öffnungen im Deckel nach (siehe grünes Quadrat).

Der Käfig mit Mutter und Wurf wurde mittels einer feinen Holzstatik im Zentrum der Noisebox angebracht (Abbildung 15). Der Käfig war konform dem Standard für Käfige für Wüstenrennmäuse im Tierhaus des Max-Planck-Institut für Neurobiologie. Zwei CPU-Lüfter an der Seite in Bodennähe förderten die Abluft aktiv nach Außen und durch mit einer Filtermembran abgedeckte Öffnungen an der Decke der Kammer konnte Frischluft nachströmen. Mit einem Messfühler im Inneren der Kammer wurde die Temperatur und Luftfeuchtigkeit während eines Versuches kontrolliert und täglich aufgezeichnet, wobei die Temperatur zwischen 20 und 24°C schwankte und die Luftfeuchtigkeit zwischen 30 und 33% lag. Außerdem wurde das Verhalten der Tiere

während des gesamten Aufenthalts in der Kammer 24 Stunden am Tag mit einer infrarotsensitiven Videokamera (YOKO-Max, Sintron, Iffezheim, Deutschland) (Abbildung 15, Insert) und einem Videorekorder mit Zeitrafferfunktion (Video Cassette Recorder BR-S920E, JVC, Friedberg (Hessen), Deutschland) jede Minute für 10 Sekunden aufgezeichnet. Dadurch konnten die Tiere beobachtet werden, ohne die Kammer zu öffnen und damit die Qualität des Rauschens zu vermindern. Der Tag/Nacht-Zyklus der Noisebox war dem im Tierraum identisch.

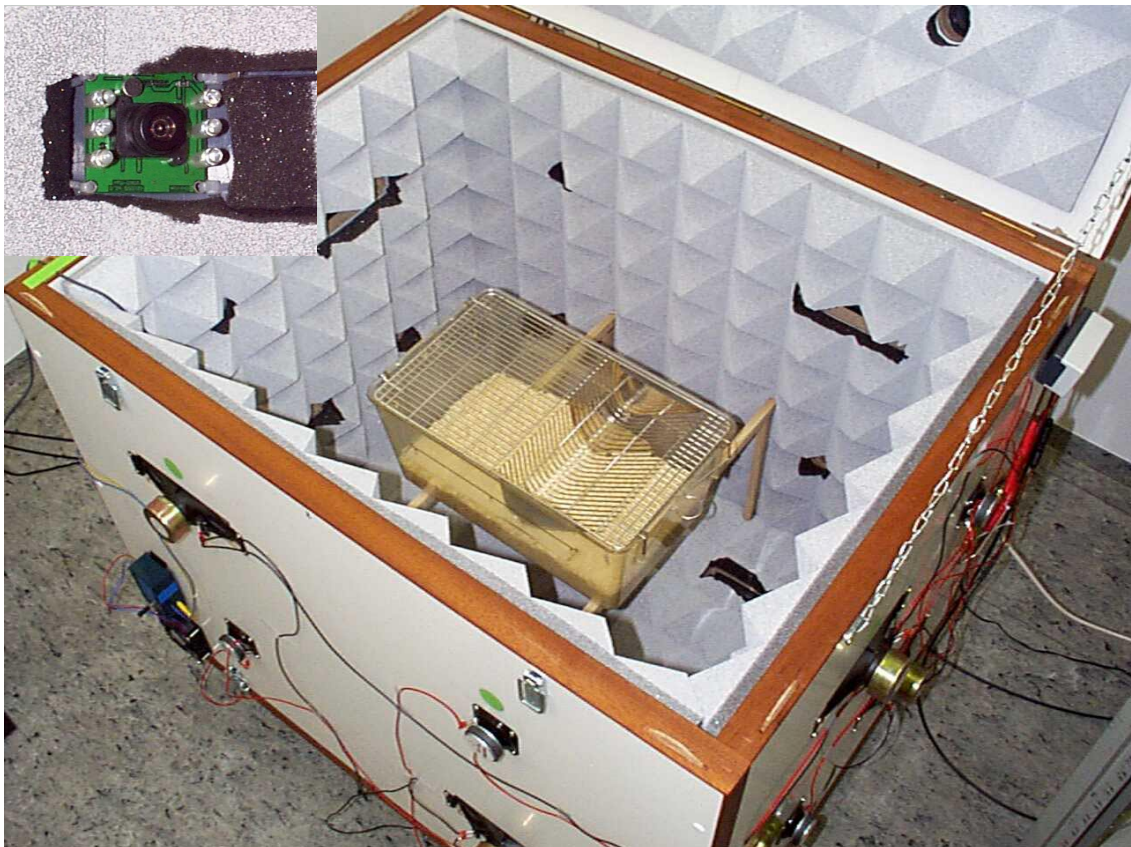


Abbildung 15 Geöffnete Noisebox von oben

Im Inneren der Noisebox ist die Isolierung mit akustischem Schaumstoff mit Öffnungen für die Lautsprecher sichtbar. Der Käfig wurde mit einer Holzplattenkonstruktion in die Mitte der Kammer positioniert. Im Bild sind das normalerweise im Käfig enthaltene Futter sowie die Trinkflasche nicht enthalten. Das kleine Foto links oben in der Abbildung zeigt die infrarotsensitive Kamera mit den sechs Infrarotleuchtdioden.

Die Jungtiere wurden mitsamt dem Muttertier an P10 in die Noisebox gesetzt und verbrachten zunächst einige Zeit (ca. 12 Stunden) ohne weißes Rauschen. Anschließend wurde das weiße Rauschen in kleinen Stufen bis zur endgültigen Lautstärke aufgedreht, so dass bereits an P11 die volle Lautstärke des Rauschens erreicht war. Die absolute

Lautstärke in der Noisebox überschritt nie 80 dB SPL (Messung mit Measuring Amplifier Brüel & Kjær Type 2636, Hochpassfilter 22,4 Hz, RMS Averaging Time fast, Brüel & Kjær pressure field ½" Microphone Type 4192, Kalibrierung mit Brüel & Kjær Sound Level Calibrator Type 4231). Diese Lautstärke verursachte bei anderen Versuchen keine Beeinträchtigung der Funktionalität des Hörsystems (Chang and Merzenich, 2003).

Die Verweildauer der Tiere in der Noisebox betrug 15 Tage. Futter und Wasser erhielten die Tiere *ad libitum*. Der Wasser- und Futternvorrat wurde per Videokamera kontrolliert und bei Bedarf ein Mal pro Versuch nachgefüllt. Die Kammer wurde während eines Versuchs also höchstens ein Mal geöffnet, dadurch wurde eine Störung des Berausens auf ein Minimum beschränkt.

Nach 15 Tagen in der Noisebox wurden die Tiere entnommen und entweder anschließend in den weiteren Versuch genommen (immunohistochemischer Teil), oder wieder in ihre normalen Käfige zurückgebracht (physiologischer Teil) und nach einer Verweildauer von 9 bis 29 Tagen für die Elektrophysiologie verwendet. Jeweils vor dem Eintritt in den weiteren Versuch wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert. Für einen besseren physischen Zustand der Tiere wurde die Wurfgröße vor jedem Noiseboxversuch auf vier Tiere reduziert.

Das Berauschen der adulten Tiere fand unter den gleichen Bedingungen statt wie bei den jungen Tieren. Lautstärke und Verweildauer waren identisch.

3.3 IMMUNOHISTOCHEMIE

Ziel des immunohistochemischen Teils dieser Arbeit war es, die Verteilung der glyzinergen Eingänge an MSO Neuronen von Wüstenrennmäusen, die unter dem Einfluß von weißem Rauschen aufgewachsen waren, und an MSO Neuronen von Ratten qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Dazu wurden verschiedene Antikörper gegen inhibitorische Synapsen verwendet (Abbildung 16).

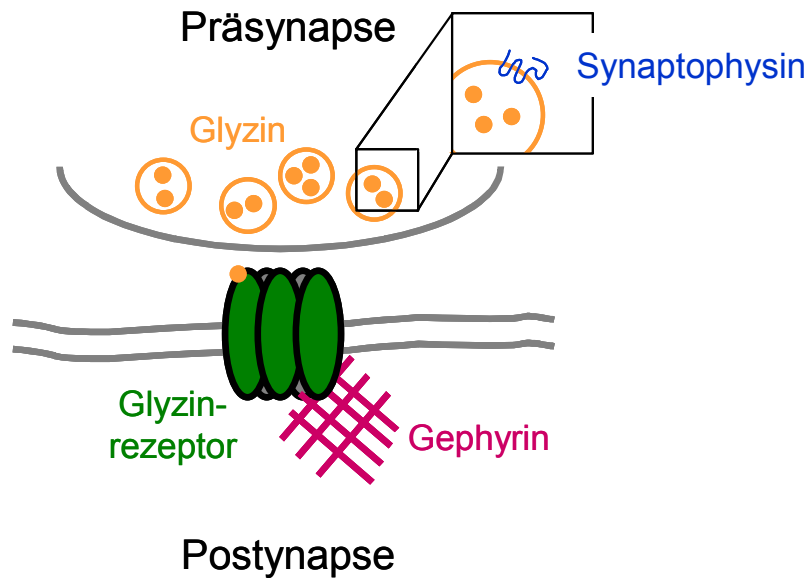


Abbildung 16 Modell einer glyzinerger Synapse

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Marker für inhibitorische Synapsen verwendet: Es wurden Antikörper gegen den inhibitorischen Transmitter Glyzin, den Glyzinrezeptor, das Membranprotein von synaptischen Vesikeln Synaptophysin, sowie das Verankerungsprotein glyzinerger Synapsen Gephyrin verwendet.

Neben einem polyklonalen Antikörper gegen die $\alpha 1$ Untereinheit von Glyzinrezeptoren wurden ein polyklonales Antiserum spezifisch für den Transmitter Glyzin und ein monoklonaler Antikörper gegen das Verankerungsprotein des Glyzinrezeptors, Gephyrin, verwendet. In einigen Versuchen wurde auch das präsynaptische Vesikelprotein Synaptophysin mit einem Antikörper markiert, jedoch waren diese Ergebnisse aufgrund mangelnder Spezifität des Antikörpers weder für qualitative noch quantitative Auswertung zu verwenden.

Um eine deutliche Kolo-kalisation von inhibitorischen Markierungspunkten mit Dendriten nachzuweisen, wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen MAP2 und SMI32, spezifischen dendritischen Markern, durchgeführt. Der hier verwendete MAP2-Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der mit Mikrotubuli assoziierten Proteinen im Gehirn von Ratten und der Maus reagiert (Huber and Matus, 1984). Seine Anwendbarkeit auf neuronales Gewebe der Wüstenrennmaus wurde erstmals von Christoph Kapfer gezeigt (Kapfer et al., 2002). Der Antikörper markiert selektiv die dendritischen Verzweigungen aller Neurone im Gehirn. SMI 32 ist ein spezifischer Antikörper für neuronale Zellkörper, Dendriten und einige dicke Axone im zentralen und peripheren Nervensystem (Sternberger and Sternberger, 1983). Der Antikörper

reagiert mit einem nicht-phosphoryliertem Epitop im Neurofilament H der meisten Spezies.

Es wurden Einfach- und Doppelfärbungen durchgeführt. Im Folgenden werden die prinzipiellen Punkte der einzelnen Färbeprotokolle besprochen. Die ausführlichen Protokolle der verschiedenen Färbungen sind im Anhang zu finden.

3.3.1 PERFUSION

Die Gehirne der Versuchstiere wurden für die Immunohistochemie perfundiert. Dabei wird das Gehirn erst mit einer physiologischen Spüllösung (ACSF) und je nach Art der Färbung zusätzlich mit einer Fixierlösung durchspült. Die Lösungen wurden vor der Perfusion auf Körpertemperatur angewärmt. Die Pumpleistung wurde der Größe des Tieres angepasst, um den Druck in den Gefäßen nicht unnatürlich zu erhöhen und ein Platzen der Gefäße zu vermeiden. Vor der Perfusion wurden die Tiere mit einer letalen Dosis von 5 %igem Chloralhydrat (ca. 1 ml pro 100 g Körpergewicht) betäubt.

Die Perfusion erfolgte transcordial am eröffneten Brustkorb mit einer Nadel über den linken Ventrikel. Der Flüssigkeitsaustritt erfolgte über den rechten Vorhof, der zu diesem Zweck eröffnet wurde. Der detaillierte Ablauf der Perfusion wurde in einer früheren Arbeit beschrieben (Seidl, 1999).

3.3.2 GLYZINREZEPTOR FLUORESZENZIMMUNOHISTOCHEMIE

Für die Glyzinrezeptorimmunohistochemie wurden 8 in der Rauschbox aufgezogenen Wüstenrennmäuse aus zwei verschiedenen Experimenten verwendet. Außerdem wurden 7 adulte Ratten (Wistar) aus verschiedenen Würfen in den Versuch genommen.

Nach 5 min Perfusion mit einer künstlichen Zerebrospinalflüssigkeit mit 0,02 % Heparin und 0,02 % Lidocain, wurde das Gehirn aus dem Schädel präpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Von den in gefrorenem Tissue Tek (SAKURA, Zoeterwoude, Niederlande) eingebetteten Gehirnen wurden mit einem Kryostat (Leica) bei -20°C 25 μm Schnitte des die MSO enthaltenen Gehirnstamms angefertigt. Die Temperatur des Kryostats ist kritisch, da zu tiefe Temperaturen die Schnitte unter Umständen brüchig werden lassen. Eine zu warme Temperatur ist ebenfalls zu vermeiden, da sonst die Schnittfestigkeit des Gewebes abnimmt. Es empfiehlt sich daher bei nicht zufriedenstellender Schnittqualität die Temperatur zu variieren. Die

Schnitte wurden anschließend auf gelatinierte Objektträger aufgebracht und getrocknet. Die Schnitte müssen gut antrocknen, da sie sich sonst beim späteren Waschen vom Objektträger ablösen können. Eine Trockenzeit bis zu 30 min schadete der Färbung nicht. Die Schnitte auf dem Objektträger wurden 8 min mit 4 % Paraformaldehyd in Küvetten fixiert. Nach dem anschließenden Waschen wurden auf dem Objektträger Fettstiftringe (PAP PEN, Science Services, München) um die einzelnen Schnitte angebracht, da alle weiteren Schritte mit kleinen Volumina direkt auf dem Objektträger durchgeführt wurden. Alle Waschschrte wurden weiter in Küvetten durchgeführt.

Im folgenden wurden die Schnitte mit 0,5 % Triton X-100 permeabel gemacht und mit einem polyklonalen Antikörper gegen die $\alpha 1$ Untereinheit des Glyzinrezeptors (Chemicon International, Temecula, San Diego, Kalifornien, USA) und einem monoklonalen Antikörper gegen MAP2 (Clone HM-2, Sigma, Deisenhofen) bzw. SMI32 (Sternberger Monoclonals Incorporated, Lutherville, Maryland, USA) markiert. Die sekundären, fluoreszenten Antikörper waren ein hasenspezifischer Cy3-gekoppelter Antikörper (Dianova, Hamburg) und ein mausspezifischer Antikörper mit Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

3.3.3 GEPHYRIN FLUORESZENZIMMUNOHISTOCHEMIE

Für diese Experimente wurden 2 adulte Ratten (Wistar) aus verschiedenen Würfen verwendet.

Die Färbung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie unter 3.3.2. beschrieben, nur wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen Gephyrin (Mab7, Alexis Biochemicals, San Diego, Kalifornien, USA) und einem polyklonalen Antikörper gegen MAP2 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien, USA) gefärbt. Als zweite Antikörper wurden Goat anti-mouse Cy3 (Dianova) und Donkey anti-rabbit Alex 488 (Molecular Probes) verwendet.

3.3.4 GEPHYRIN-DAB IMMUNOHISTOCHEMIE

Für diesen Teil wurden 4 adulte Ratten und 4 junge (P10) Ratten (beides Wistar) aus verschiedenen Würfen verwendet.

Die Tiere wurden mit einer jeweils 0,02 % Heparin und Lidocain enthaltenden Ringerlösung (3 min), und einer Fixierlösung mit 4 % Paraformaldehyd und 0,2 %

Glutaraldehyd für 45 min perfundiert. Die Hirne wurden aus dem Schädel präpariert, für ca. 4 Std nachfixiert und bis zur Weiterverarbeitung in 0,5 M Phosphatpuffer aufbewahrt. An einem Vibratom (Campden Instruments LTD mit Eigenanbau eines Zeiss Binokular) wurden 25 µm Schnitte angefertigt. Das Gewebe wurde mit 0,1 % Triton X-100 permeabel gemacht und mit monoklonalem Antikörper für Gephyrin (Mab7, Connex GmbH, Planegg/Martinsried) gefärbt. Weiter wurde der 1. Antikörper mit Anti-Maus Biotin und Avidin-Biotin-Peroxidase markiert und durch Zugabe von DAB (3,3-Diaminobenzidin) sichtbar gemacht.

3.3.5 GEPHYRIN-DAB IMMUNOHISTOCHEMIE FÜR ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Eine von P10 bis P25 dem weißen Rauschen ausgesetzte Wüstenrennmaus wurde für die Elektronenmikroskopie verwendet und ebenfalls mit Gephyrin-Antikörper gefärbt.

Die Perfusion erfolgte wie unter 3.3.4 schon beschrieben. Anschließend wurden am Vibratom (s.o.) 100 µm Schnitte des die MSO enthaltenden Hirnstamms angefertigt. Gegen Gephyrin wurde wie unter 3.3.4 gefärbt, jedoch ohne Triton. Im Anschluss an die Färbung wurden die Gehirnschnitte in 4 % Glutaraldehyd in Phosphatpuffer nachfixiert, erst 10 Std. bei Raumtemperatur, dann 6 Tage bei 4° C. Dann wurden die Schnitte für 1 Std. osmifiziert (Osmium 1 %), dehydriert und in Araldit (Fluka, Basel, Schweiz) eingebettet. Für Lichtmikroskopie, zur Auswahl von MSO Zellen, wurden semidünne Schnitte (1 µm) mit Toluidin Blau gegengefärbt. Ultradünne Schnitte (100 nm, angefertigt an Ultracut LKB) wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat gegengefärbt und anschließend an einem Zeiss EM 10 Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

3.3.6 KONFOKALE MIKROSKOPIE

Sämtliche Doppelfärbungen wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Die damit gefärbten Gewebe wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops aufgenommen.

Bei der konfokalen Mikroskopie wird Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, ausgeblendet. Das Prinzip eines konfokalen Mikroskops ist in Abbildung 17 gezeigt. Eine Lochblende (engl. pinhole) vor dem Photodetektor oder

Photomultiplier sorgt dafür, dass nur Licht aus dem Brennpunkt aufgenommen wird. Dadurch kann die Fluoreszenz eines definierten Punktes in dem gefärbten Gewebe aufgenommen werden. Mit zwei verstellbaren Spiegeln und dem Objektiv kann der die Fluoreszenzfarbstoffe anregende Laserstrahl so in x-, y- und z-Richtung abgelenkt werden, dass jeder Punkt im Gewebe optisch abgetastet werden kann.

Bei der fluoreszenten Doppelfärbung werden die beiden sekundären, mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörper so gewählt, dass sich ihre Emissionsspektren nicht überlappen (Abbildung 18). Dadurch können die gefärbten Antigene mit demselben Laserstrahl durch zwei verschiedene Kanäle aufgenommen werden.

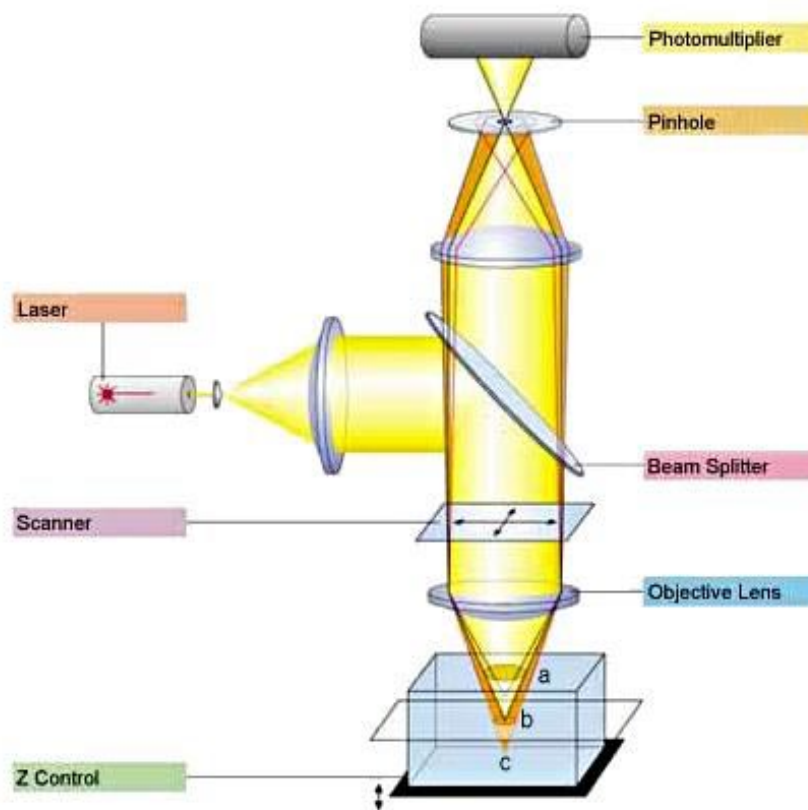


Abbildung 17 Prinzip der konfokalen Mikroskopie

Licht von einem Laser trifft auf das gefärbte Gewebe und erzeugt durch Anregung der Fluorophore Fluoreszenz. Durch das Pinhole wird nur reflektiertes Licht von einem bestimmten Punkt mit dem Photomultiplier detektiert. Der Fokus dieses Punktes wird entlang verschiedener Ebenen durch das Gewebe bewegt und tastet so sukzessive den gesamten Schnitt ab. Quelle www.zeiss.de.

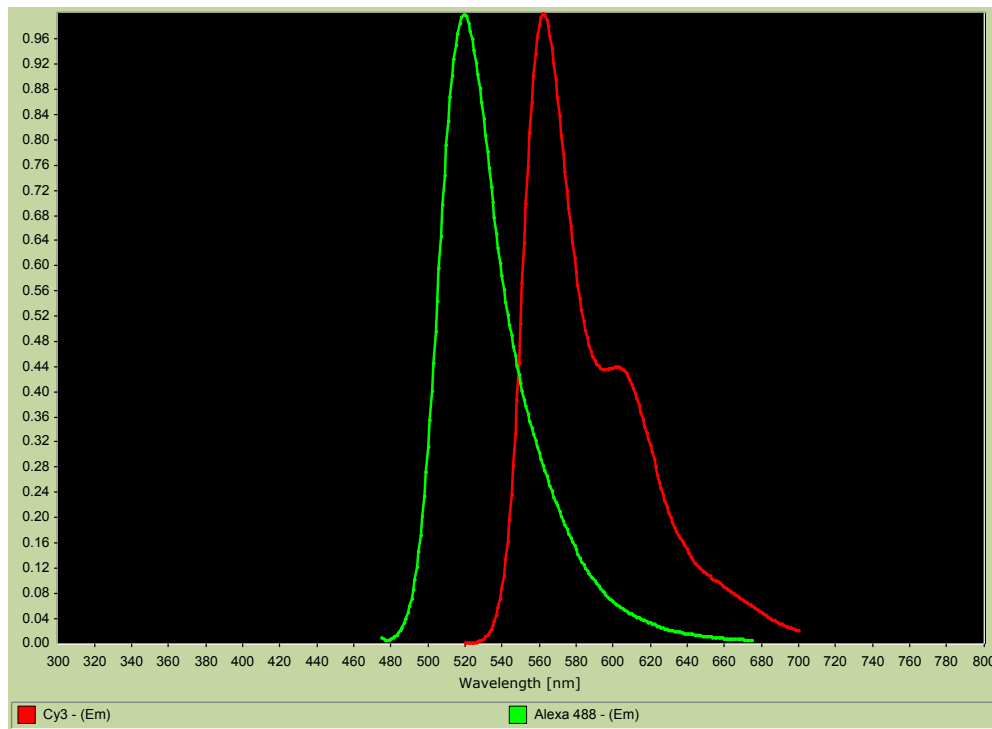


Abbildung 18 Emissionsspektren von Alexa 488 und Cy3

In der Grafik sind die Abstrahlungsintensitäten von Alexa 488 (grün) und Cy3 (rot) als Funktion der Abstrahlungsfrequenz abgebildet. Die Spitzen der beiden Emissionsspektren überlappen sich nicht, die gleichzeitige Aufnahme von beiden Farbstoffen mit dem konfokalen Mikroskop ist also möglich. Plot generiert mit einer Datenbank von BIO-RAD (<http://fluorescence.nexus-solutions.net/frames6.htm>).

3.3.7 QUALITATIVE WEITERVERARBEITUNG DER AUFNAHMEN

Von den 20 μm dicken Gewebeschnitten wurden Aufnahmen von 1 μm bzw. 2 μm Dicke gemacht, die später in Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, Kalifornien, USA) zu sogenannten Maximum-Intensity Projektionen zusammengefügt wurden. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden in zwei getrennten Kanälen aufgenommen. Durch Maximum-Intensity Aufnahmen wurde eine Vorauswahl der zu verarbeitenden Schnitte getroffen. Wenn ein Ausschnitt gefunden wurde, der sowohl ein gefärbtes Soma und Dendriten, als auch eine ausgeprägte synaptische Färbung enthielt, wurden die die Struktur enthaltenden Schichtaufnahmen zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Mit der Funktion ‚apply image‘, blending mode ‚lighten‘ wurden die verschiedenen Schichten eines Farbkanals aufeinander addiert. ‚Lighten‘ führt dazu, dass bestimmte, in mehreren Schichten vorkommende Pixel sich nicht zu einem stärkeren Signal aufsummieren und damit die Schärfe des Bildes verschlechtern. Die beiden resultierenden Bilder der verschiedenen Farbkanäle wurden dann mit der Funktion

‚apply image‘, blending mode ‚add‘ zum endgültigen Gesamtbild zusammengefügt. Desweiteren wurde den Aufnahmen noch eine künstliche Farbe zugewiesen und einzelne Kanäle teilweise kontrastverstärkt.

In den auf Objektträgern aufgebrauchten gefärbten Hirnstammschnitten von Wüstenrennmäusen wurde die MSO optisch nach Kriterien von Nordeen (Nordeen et al., 1983) identifiziert. Bei der Ratte kann die MSO als dreieckiger Nukleus medial der LSO erkannt werden.

Zur qualitativen Analyse wurden Aufnahmen der MSO bzw. von einzelnen MSO Neuronen bei verschiedenen Vergrößerungen gemacht. Hierbei sollte möglichst die bipolare Struktur der Zellen und die Kollokalisierung von dendritischem Marker und inhibitorischen synaptischem Marker deutlich sein.

3.3.8 QUANTITATIVE ANALYSE DER FLUORESCENZFÄRBUNGEN

Insgesamt wurden 8 MSOs von 4 im Rauschen aufgewachsenen Tieren analysiert.

Für die quantitative Analyse der Gerbil MSO Neurone wurde versucht von jeder MSO vier Aufnahmen zu machen (Abbildung 19). Jedes der Bilder sollte einen Teil des Somabereiches und die sich nach lateral bzw. medial erstreckenden Dendriten enthalten. Die dorsolaterale Ausdehnung der für die weitere Analyse bestimmten Bilder musste mindestens 40 µm betragen (Abbildung 20).

Die eigentliche quantitative Analyse der Verteilung der Glyzinrezeptoren auf den Dendriten in Abhängigkeit zu der Entfernung vom Zellsoma erfolgte mit dem Computerprogramm DIGITRACE (IMATEC, Miesbach, Deutschland). DIGITRACE zählt Pixel mit bestimmter Größe und bestimmter Graustufe und fasste sie in 20 µm Abschnitte relativ zum Somaabstand zusammen. Für die Auswertung mit DIGITRACE mussten die aufgenommenen Bilder so gedreht werden, dass die Dendriten sich waagrecht von links nach rechts erstrecken (Abbildung 20). Hierbei wurde nicht zwischen sich nach lateral oder medial erstreckenden Dendriten unterschieden.

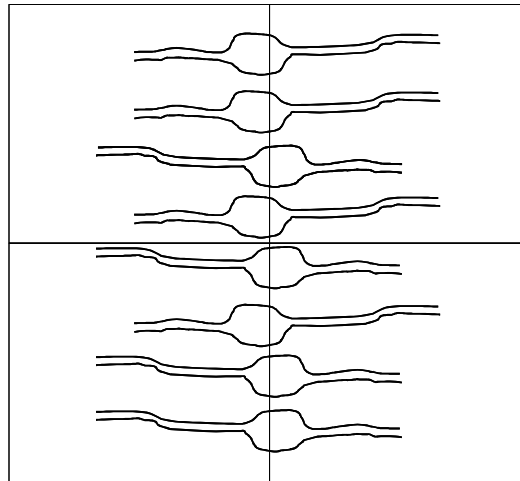


Abbildung 19 Bildliche Darstellung der vier Aufnahmen einer MSO

Von jeder MSO in einem Gehirnschnitt wurden für die spätere Quantifizierung vier Aufnahmen gemacht, auf denen möglichst immer die Dendriten in ihrer vollen Länge enthalten sein sollten. Für die weitere Analyse wurde die Lage der Dendriten im Gehirnschnitt (lateral oder medial) nicht berücksichtigt.

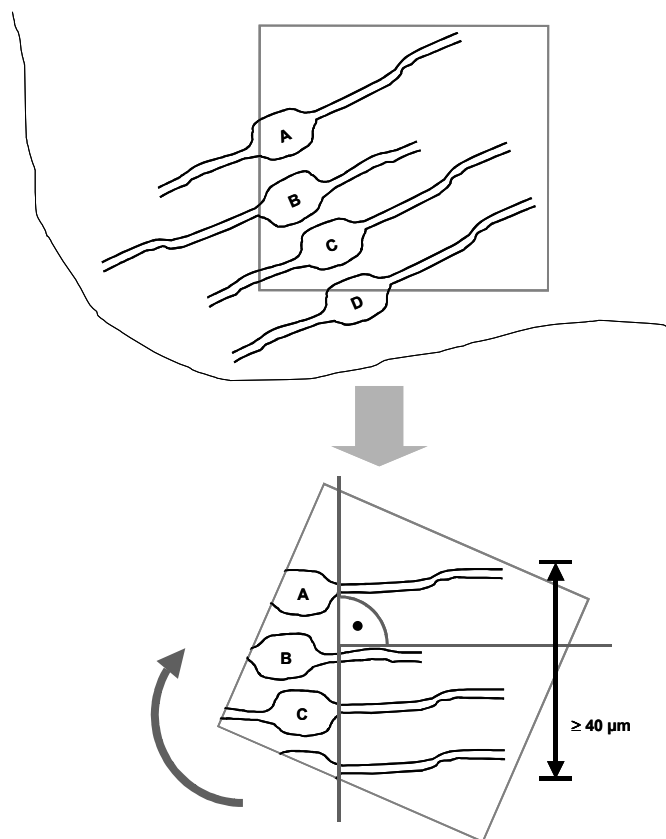


Abbildung 20 Drehen der konfokalen Aufnahmen für die Analyse

Für die Analyse mit Digitrace müssen die am konfokalen Mikroskop aufgenommenen Bilder so ausgerichtet werden, dass die Dendriten sich in einem rechten Winkel von links nach rechts erstrecken.

Die aus der Auszählung mit Digitrace resultierenden Punktedichten pro Dendritenabschnitt wurden auf den proximalsten Abschnitt normalisiert und in Relation zum Abstand vom Soma verglichen.

Statistische Unterschiede in den Verteilungen der Glyzinrezeptoren wurden mit dem Mann-Whitney U Test für zwei unabhängige Verteilungen bestimmt.

Die durch Digitrace erhaltenen Zahlen wurden an Beispielen durch Handauszählungen kontrolliert. Dabei wurden die von Digitrace ausgezählten Dendritenstücke in Adobe Photoshop in 20 μm unterteilt und die einzelnen Glyzinrezeptorpunkte von Hand ausgezählt (Abbildung 21). Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Auszählung per Hand und mit Digitrace ($P > 0,29$; Mann-Whitney U Test).

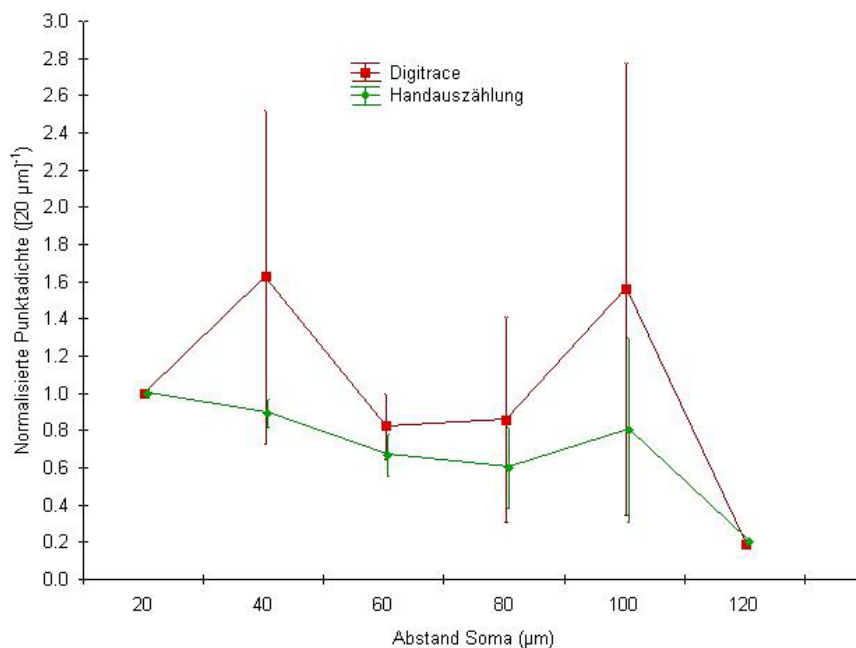


Abbildung 21 Vergleich zwischen Auszählung per Hand und mit Digitrace

Im direkten Vergleich einzelner Zellen ($n=11$) ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Auswertung mit Digitrace und der Auswertung per Hand (Fehlerbalken: Mittlere Standardabweichung; $P > 0,29$; Mann-Whitney U Test).

3.3.9 QUANTIFIZIERUNG DER DAB-FÄRBUNGEN

Diese Analyse umfasste jeweils 50 gegen Gephyrin gefärbte Zellen von 2 erwachsenen und 4 jungen Ratten, sowie 50 Zellen von 2 adulten Ratten aus früheren Versuchen, die gegen Glyzin gefärbt, aber noch nicht quantifiziert waren (Kapfer, 1999).

An einzelnen Zellen wurde die Punktedichte am Soma bzw. an den in 10 μm Abschnitte unterteilten Dendriten ermittelt. Die Zellen wurden an einem Standard Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot) mit Hilfe eines Zeichentubus nachgezeichnet und die Punkte in den verschiedenen Abschnitten gezählt. Der Somaumfang einzelner Zellen wurde unter Verwendung von Digitrace bestimmt und die Punktedichte pro μm für die einzelnen Abschnitte (Soma und 10 μm Dendritenstücke) berechnet.

Statistische Unterschiede der Gephyrin- und Glyzinpunktedichte wurden mit dem Mann-Whitney U Test für zwei unabhängige Verteilungen bestimmt.

3.4 ELEKTROPHYSIOLOGIE

Die durchgeführten elektrophysiologischen Experimente fanden *in vivo* am narkotisierten Tier statt. Alle Experimente waren akut, d.h. die Tiere erwachten nach Beendigung des Versuchs nicht.

3.4.1 DER DNLL

Alle in dieser Arbeit vorgestellten Ableitungen wurden im dorsalen Nukleus des lateralen Lemniscus (DNLL) durchgeführt. Die Entscheidung die ITD-Sensitivität im DNLL zu messen, fiel aufgrund der Tatsache, dass elektrophysiologische Ableitungen in der MSO wiederholt als sehr schwierig beschrieben wurden (Goldberg and Brown, 1969; Yin and Chan, 1990; Spitzer and Semple, 1995). Der DNLL befindet sich genau ventral vom auditorischen Mittelhirn, dem IC, und ist einer der drei Hauptkerngebiete (dorsaler, medialer und lateraler Lemniscus) die in den Fasern des lateralen Lemniscus eingebettet sind. Der DNLL erhält monaurale und binaurale Eingänge von verschiedenen Stationen des auditorischen Stammhirns, und sendet seinerseits inhibitorische Projektionen zum contralateralen DNLL und zum bilateralen IC (Wu, 1999) (Abbildung 22).

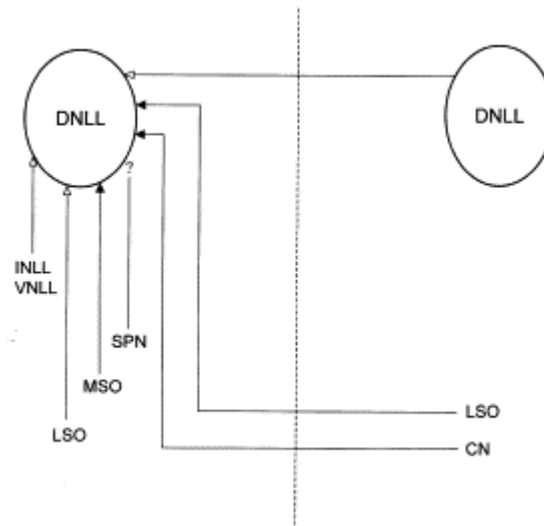


Abbildung 22 Eingänge zum dorsalen Nucleus des lateralen Lemniscus

Schematisches Diagramm von den wichtigen erregenden und hemmenden Eingängen zum DNLL. Schwarze Pfeilspitzen zeigen exzitatorische Projektionen, weiße Pfeilspitzen inhibitorische Projektionen. Die gestrichelte Linie deutet die Mittellinie des Gehirns an. Abbildung aus (Wu, 1999).

Die MSO sendet einen erregenden Eingang zum ipsilateralen DNLL (Abbildung 4). Somit sollten DNLL Zellen die ITD-Sensitivität der MSO widerspiegeln (vgl. auch Fitzpatrick and Kuwada, 2001).

3.4.2 PRÄPARATION

Nach dem Verabreichen einer subkutanen Initialnarkose wurde gewartet bis das Tier keinen Fußrückziehreflex mehr zeigte und nicht mehr empfindlich auf Zwicken in die Ohren war. Das subkutan verabreichte Narkosegemisch bestand aus Ketamin (10 mg/100 g Körpergewicht) und Xylazin (Markenname Rompun) (2%) für adulte Tiere. Bei den 14 bzw. 15 Tage alten Tieren wurde die relative Menge an Xylazinhydrochlorid um 50 % verringert. Nach dem Einsetzen der Narkose wurde der Knochen des oberen Schädels freipräpariert und mit Zahnzement (Denthesive II, Adhesive bond II, Charisma; Heraeus Kulzer, Armonk, NY, USA) ein Metallnagel rostral der Bregmanahat am Schädel befestigt, um damit den Kopf des Tieres in der Ableitapparatur zu fixieren. Über dem IC wurde mit einem Zahnarztbohrer (Synea WA-86 A, W&H Dentalwerke Bürmoos GmbH, Bürmoos, Österreich) ein kleines Loch mit ca. 0,5 mm Durchmesser in der Schädeldecke freigelegt.

Die durch die Kreuzungspunkte des Bregma und Lambda (Abbildung 23) und durch zwei Punkte definierten Abstands lateral zum Lambdapunkt definierte Ebene wurde horizontal, orthogonal zur Elektrodevorschubrichtung, ausgerichtet. Die Elektroden wurden zwischen 1800 und 2400 μm lateral und 700 bis 900 μm caudal des Lambdapunktes (Abbildung 23) eingebracht. Diese Stelle wurde vorher durch anatomische Versuche und den stereotaxischen Gerbil-Hirnatlas (Loskota et al., 1974) ermittelt. Dabei wurde an definierten Stellen im Hirnstamm ein Farbstoff eingebracht und die benötigte Elektrodenposition für Ableitungen im DNLL ermittelt.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Physiologieversuchen waren die Tiere unter ständiger Narkose. Während des Experiments wurde die Narkose im Abstand von 30 Minuten mit einer intramuskulär verabreichten Dosis von 0.05 ml der Narkosemischung aufrechterhalten. Die Ableitungen erfolgten in einer selbstkonstruierten schalldichten Kammer vorgenommen. Während des Experiments wurde die Körpertemperatur mit Hilfe eines Wärmekissens (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard) auf 39° C gehalten. Die Körpertemperatur wurde dabei mit einem Temperaturfühler auf der Bauchseite des Tieres gemessen. Bei 14 und 15 Tage alten Wüstenrennmäusen wurden in Abständen von 30 min zusätzlich 0,05 ml einer 1:1 Mischung von 0,9% NaCl-Lösung und einer Nährlösung (Stereofundin VG-5, B. Braun, Melsungen) subkutan verabreicht.

Die Dauer der Experimente variierte zwischen 8 und 16 Stunden, wobei Experimente mit P14/P15 Tieren die Dauer von 12 Stunden wegen frühzeitigen Exitus nicht überschritten. Bei den erst zwei Wochen alten Tieren ist die Spanne der Narkose zwischen Überdosierung und Aufwachen sehr klein, so dass die Gefahr eines Todes durch Überdosierung der Narkose sehr groß ist. Außerdem scheinen die jungen Tiere die Narkose insgesamt schlechter zu vertragen als adulte Tiere. Am Ende der Experimente wurden die Tiere bei Bedarf mit einer 0,05 ml Injektion von T61 (Intervet International GmbH, Wiesbaden) getötet.

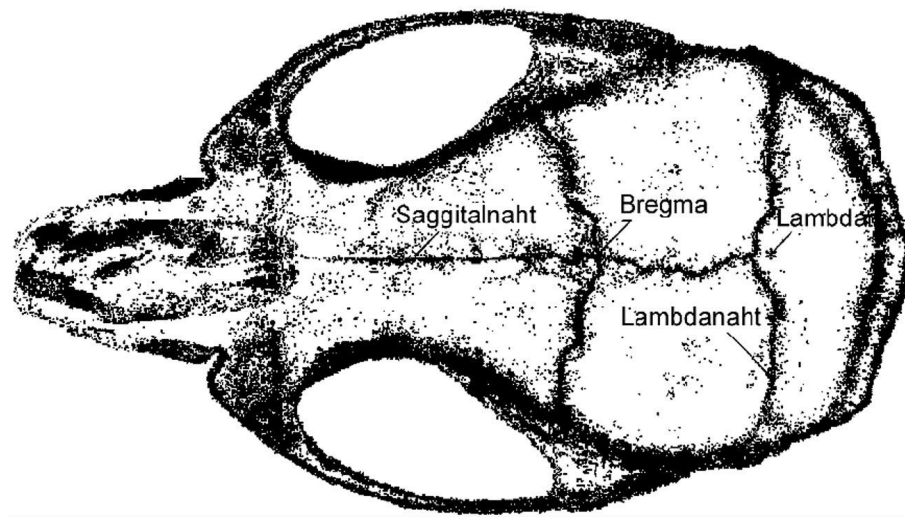


Abbildung 23 Dorsale Ansicht eines Säugetierschädels

In dieser dorsalen Aufsicht eines Schädels sind die Lage von Bregma und Lambda zu erkennen. Anhand der beiden Punkte wurde die Stereotaxie des Schädels definiert.

Nach dem Einbringen einer Ableitelektrode erfolgte die Präsentation der akustischen Stimuli um akustisch sensitive Gehirnareale zu identifizieren. Die Präsentation der Stimuli erfolgte mittels zwei Beyer Dynamics Lautsprechern (Model DT 990, beyerdynamic, Heilbronn), die mit Schläuchen (innerer Durchmesser 2 mm) definierter Länge mit dem Gehörgang verbunden waren, bzw. mit zwei Sony-Lautsprechern (MDR-EX70LP, Sony Deutschland GmbH, Köln-Ossendorf), die durch ein ca. 5 mm langes Kunststoffröhrchen ebenfalls mit dem Gehörgang verbunden waren. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Schläuche dicht mit dem Høreingang abschlossen. Bei den jungen Gerbils wurde das Außenohr caudal des Tragus eingeschnitten und der Tragus nach unten geklappt, damit der Gehörgang besser zugänglich war. Die Generierung der Stimuli erfolgte mit Hilfe computergestützter Software (Spike, Computerprogramm in Eigenregie; Brainware, Tucker Davis Technologies, Alachua, FL, USA) und Tucker-Davis-Technologies (TDT) System II und III Hardware. Zur manuellen Stimulusgenerierung, z.B. um die Bestfrequenz audiovisuell zu bestimmen (siehe unten), wurde ein Funktionsgenerator der Firma Toellner (7706A, TOELLNER Electronic Instrumente GmbH, Herdecke) eingesetzt. Die prinzipielle Anordnung der einzelnen Bestandteile ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

Der Suchstimulus bestand aus einem binaural präsentierten Sinuston dessen Frequenz zwischen von 50 Hz und 15 bzw. 40 kHz bei der geringsten Abschwächung

(20 dB) in Schritten von 100 Hz durchgestuft wurde. Die Stimuluslänge des Suchstimulus betrug 100 ms, die Anstiegs- und Abfallzeit jeweils 5 ms.

Der Elektrodevorschub erfolgte mit einem Mikromanipulator (Burleigh Inchworm Controller 8200, EXFO, Vanier (Quebec), Kanada). Einzelne Zellen wurden extrazellulär mit 1 und 5 M Ω Elektroden (World Precision Instruments, Berlin bzw. Science Products GmbH, Hofheim) abgeleitet. Ab einer Tiefe von etwa 2000 μ m von der Gehirnoberfläche wurden normalerweise die ersten akustisch induzierten Signale vom IC empfangen. Akustisch induzierte Signale sind zeitlich an die akustischen Stimuli gekoppelt. Wird der akustische Stimulus stark abgeschwächt oder nicht mehr präsentiert, so verschwindet das akustisch induzierte Signal. Mit größerer Eindringtiefe wurde die charakteristische Antwort des IC immer hochfrequenter, was der Tonotopie des IC entspricht. Ab etwa 4000 bis 6000 μ m konnten akustisch induzierte Signale des DNLL abgeleitet werden.

Die BF einer Zelle, also die Frequenz bei der die Zelle am empfindlichsten auf akustische Reizung war, wurde mit Hilfe einer Tuningkurve bestimmt. Dabei wurden verschiedene Frequenzen binaural ohne interauralen Zeitunterschied bei verschiedenen Abschwächungen präsentiert. Die Dauer des Stimulus betrug 40 ms, die Anstiegs- und Abfallzeit 5 ms. Die ITD-Stimuli waren 100 oder 200 ms lang und die Lautstärke wurde 20 dB über der Schwelle an der BF eingestellt. Es wurden 4 Stimuli pro Sekunde ausgegeben, die Anstiegs- und Abfallzeit des Stimulus betrug 5 ms. Die Stimulusverzögerung war konstant am contralateralen Ohr und variierte in 50 oder 100 μ s Schritten am ipsilateralen Ohr. Das Spektrum an ITDs umfasste mindestens einen Zyklus der Stimulusfrequenz. Jede einzelne ITD wurde in zufälliger Reihenfolge zwischen 20 und 80 Mal wiederholt. Alle anderen Stimuli (IID, monaurale und binaurale Ratenintensitätsfunktionen) hatten ebenfalls eine Anstiegs- und Abfallzeit von jeweils 5 ms und waren von 100 ms (IID, monaurale Ratenintensitätsfunktion) oder 40 ms (binaurale Ratenintensitätsfunktion) langer Dauer. Die Kalibrierung der Stimuligenerierung und der Lautsprecher erfolgte unter Verwendung eines ¼ Inch Mikrophons (Reinstorp VtS, Deutschland), einem Meßverstärker (MV 302, Microtech, Gefell) und einem Wellenformanalysierer (model SR770 FFT network analyzerStanford Research Systems, Sunnyvale, CA, USA).

Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit Spike und Brainware Software.

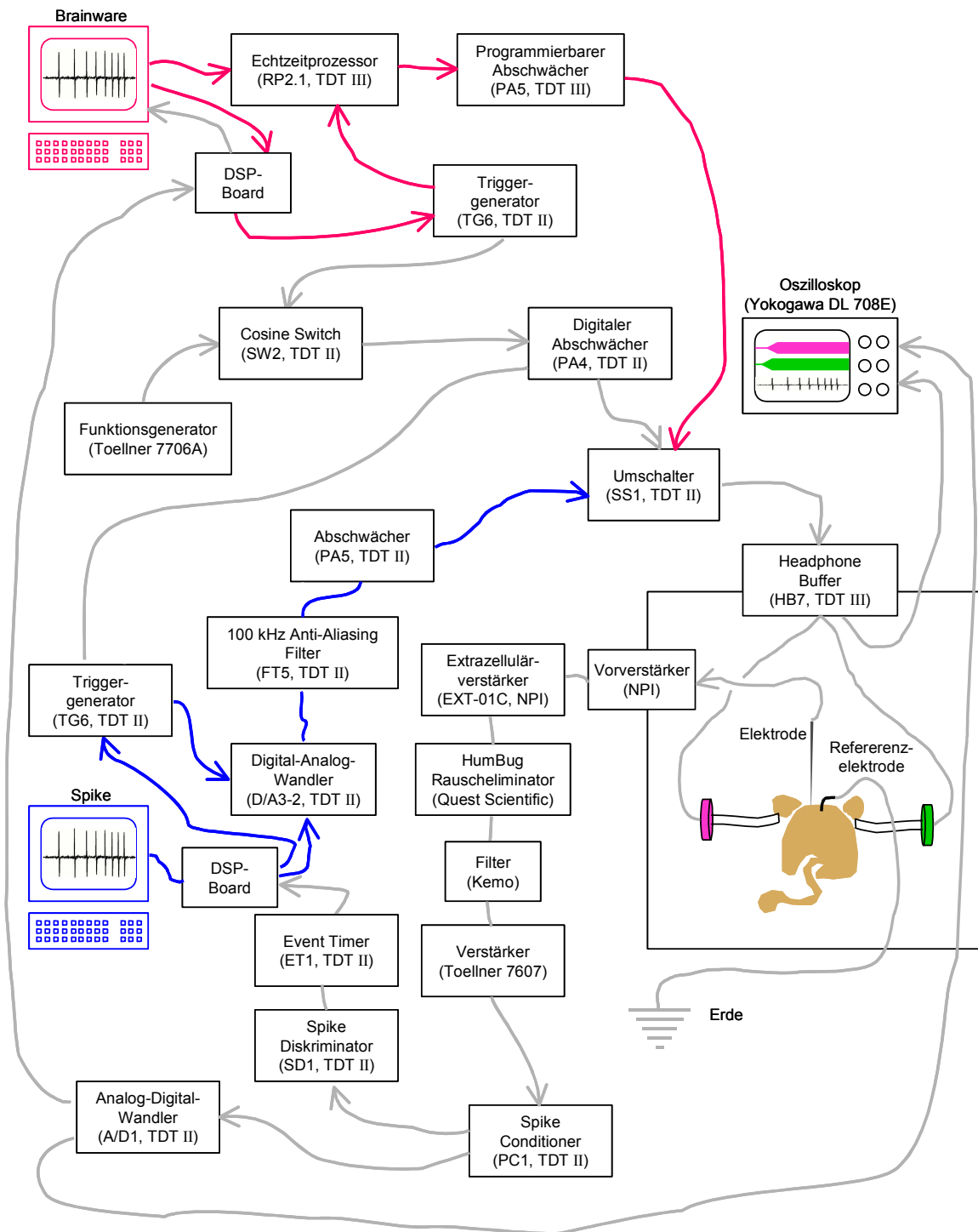


Abbildung 24 Schematischer Aufbau des *In-vivo* Setups

Schematische Illustration des Stimulus- und Ableitschaltkreises. Die Stimulation mit ‚Spike‘ ist in blau, mit ‚Brainware‘ in rot dargestellt. Die Stimuluspräsentation mittels Funktionsgenerator und der Ableitschaltkreis sind grau abgebildet. Zeichnung der Wüstenrennmaus frei nach (Schuett et al., 2002).

3.4.3 TIERGRUPPEN

Wüstenrennmäuse der Kontrollgruppe wurden im Tierhaus des Max-Planck-Instituts gezüchtet und waren mindestens einen Monat alt (Durchschnittsalter 59 Tage) bevor sie in den Versuch kamen. Die Rauschexposition der jungen und adulten Tiere wird bereits unter 3.2 beschrieben. Junge Tiere wurden 14 oder 15 Tage nach Geburt in den Versuch genommen.

3.4.4 DATENANALYSE

Die Analyse der Daten erfolgte nach den Experimenten mit Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA), STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) und MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA). Die beste IPD der einzelnen ITD-Funktionen wurde nach Auswertung individueller Spikezeiten und einer Vektoranalyse nach Goldberg und Brown (Goldberg and Brown, 1969) ermittelt. Die maximale Steigung der ITD-Funktionen wurde mit der Bestimmung des Wendepunktes einer angepassten sigmoidalen Funktion (Formel 1) berechnet.

$$\frac{a}{b + \exp(-c \cdot x)}$$

Formel 1 Allgemeine sigmoidale Funktion

Die Variablen der allgemeinen sigmoidalen Funktion wurde mit STATISTICA ermittelt und die Funktion so an die ITD-Funktionen angeglichen.

Die sigmoidale Funktion wurde zwischen Minimum und Maximum der ITD-Funktion angepasst. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 25 gezeigt.

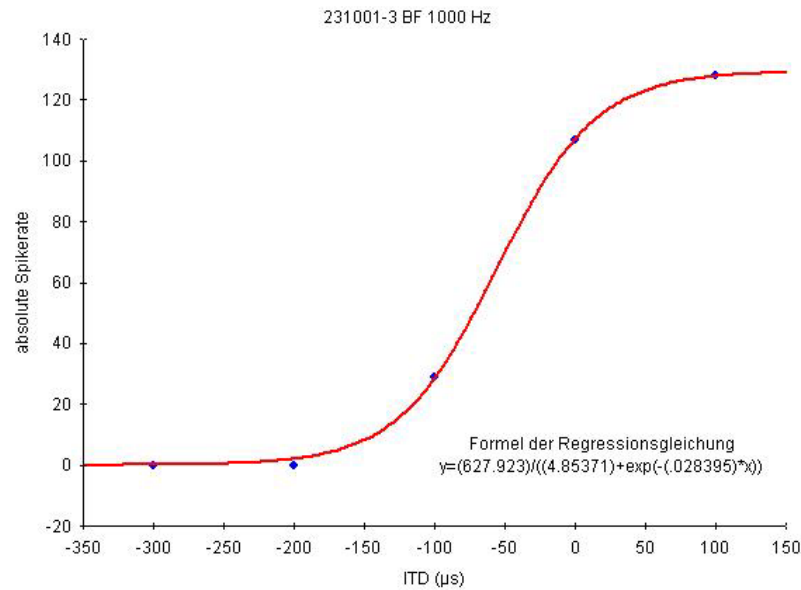


Abbildung 25 Regressionsgleichung einer ITD-Funktion

Beispiel einer Regressionsgleichung an eine ITD-Funktion. Eine normale sigmoidale Funktion wurde vom Minimum bis zum Maximum der ITD-Funktion angepasst. Daten aus der ITD-Funktion an der BF von Abbildung 75. Die ermittelte maximale Steigung liegt bei $-55,6 \mu\text{s}$.

Von der erhaltenen Regressionsgleichung wurde die ITD des Wendepunktes, also der steilste Punkt berechnet. Für das Beispiel in Abbildung 25 liegt die maximale Steigung bei $-55,6 \mu\text{s}$.

Zur Bestimmung von Monotonie bzw. des Grades von nicht-monotonem Verhalten der binauralen Ratenintensitätsfunktionen wurde die Spikerate bei der höchsten Stimulusintensität durch die höchste Spikerate geteilt (vgl. Park et al., 2003).

Statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Verteilungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit dem Kolmogorov-Smirnov Test bestimmt, da neben Unterschieden zwischen den Mittelwerten auch Unterschiede in der Standardabweichung zwischen den einzelnen Verteilungen zu erwarten waren. Der statistische Vergleich der mittleren Reizschwellen der verschiedenen Gruppen erfolgte mit dem t-Test für unabhängige Verteilungen.

Die Strenge oder Güte einer Korrelation wird anhand des Korrelationskoeffizienten r angegeben. Ab einem $r > 0,65$ oder $< -0,65$ waren die Werte gut korreliert.

4 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse dieser Arbeit gliedern sich im wesentlichen in drei Teile:

- Erstens sollte der Einfluss der Hörerfahrung auf die Entwicklung der glyzinerger Synapsen an MSO-Zellen bei der Wüstenrennmaus anhand der Verteilung an den Dendriten untersucht werden.
- Zweitens sollte dieses Ergebnis mit der Verteilung der inhibitorischen Synapsen an MSO-Zellen eines nur hochfrequent hörenden Tieres, der Ratte, verglichen werden.
- Der dritte und letzte Punkt war die physiologische Untersuchung der Entwicklung der ITD-Kodierung und des Einflusses der Hörerfahrung auf die Verarbeitung von ITDs bei der Wüstenrennmaus.

4.1 EINFLUSS DER HÖRERFAHRUNG AUF DIE VERTEILUNG GLYZINERGER SYNAPSEN AN MSO-ZELLEN DER WÜSTENRENNMAUS

4.1.1 FLUORESZENZDOPPELFÄRBUNG

Es wurden 7 in weißem Rauschen aufgezogene Wüstenrennmäuse (engl. noise raised animal, NRA) in bezug auf ihre Verteilung der Glyzinrezeptoren auf den Dendriten in Abhängigkeit zum Abstand vom Soma untersucht. Zusätzlich wurde die Struktur von inhibitorischen Synapsen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen analysiert, um Hinweise für die normale Funktionalität dieser Eingänge zu suchen.

Anhand dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob die im adulten Tier gefundene Restriktion inhibitorischer Synapsen auf das Soma tatsächlich auf richtungsspezifische binaurale akustische Signale während der Entwicklung angewiesen ist, oder ob sie rein durch binaurale Aktivität bestimmt wird. Durch monaurale Cochleaablationen wurde bereits gezeigt, dass die normale Entwicklung die Existenz beider Höreingänge voraussetzt (Kapfer, 1999). Das Entfernen einer Cochlea ist jedoch ein starker Eingriff in das System, der nicht nur die neuronale Aktivität verändert, sondern auch unspezifische, z.b. degenerative Prozesse auslöst, die einen Einfluss auf die Segregation der inhibitorischen Synapsen haben könnten. Um daher

ausschließlich die Hörerfahrung zu beeinflussen, wurden Wüstenrennmäuse von P10 bis P25 omnidirektionalem weißem Rauschen ausgesetzt (siehe Kapitel 3.2). Die Intensität des Rauschens (< 80 dB SPL) war so eingestellt, dass nicht alle richtungsspezifischen Signale eliminiert (besonders im Nahfeld), sondern stark maskiert wurden (Withington et al., 1990). Das Breitbandrauschen von allen Seiten präsentierte viele verschiedene ITDs bei allen Frequenzen und überlagerte somit natürlich vorkommende interaurale Zeitdifferenzen.

In Abbildung 26 ist die MSO einer im Rauschen aufgezogenen Wüstenrennmaus zu sehen. Der Gehirnschnitt wurde mit Antikörpern gegen MAP2 (blau) und Glyzinrezeptor (gelb) gefärbt. Klar zu erkennen ist das sich in einer geraden Linie von dorsal nach ventral ausdehnende Zellband. Die sich nach lateral und medial erstreckenden Dendriten sind nur im ventralen Teil gut zu erkennen. Im dorsalen Teil erscheinen die Dendriten ungeordneter. Die Form der MSO und die Anordnung der einzelnen Neurone von NRA-Tieren zeigt keine offensichtlichen Unterschiede zur MSO in normalen adulten Tieren. Teilweise ist an einzelnen Dendriten die gelbe Glyzinrezeptorfärbung noch sehr weit distal zu erkennen. Viele Dendriten lassen sich jedoch nicht in ihrer ganzen Länge verfolgen, was daran liegt, dass die Dendriten z.T. aus der Schnittebene laufen.

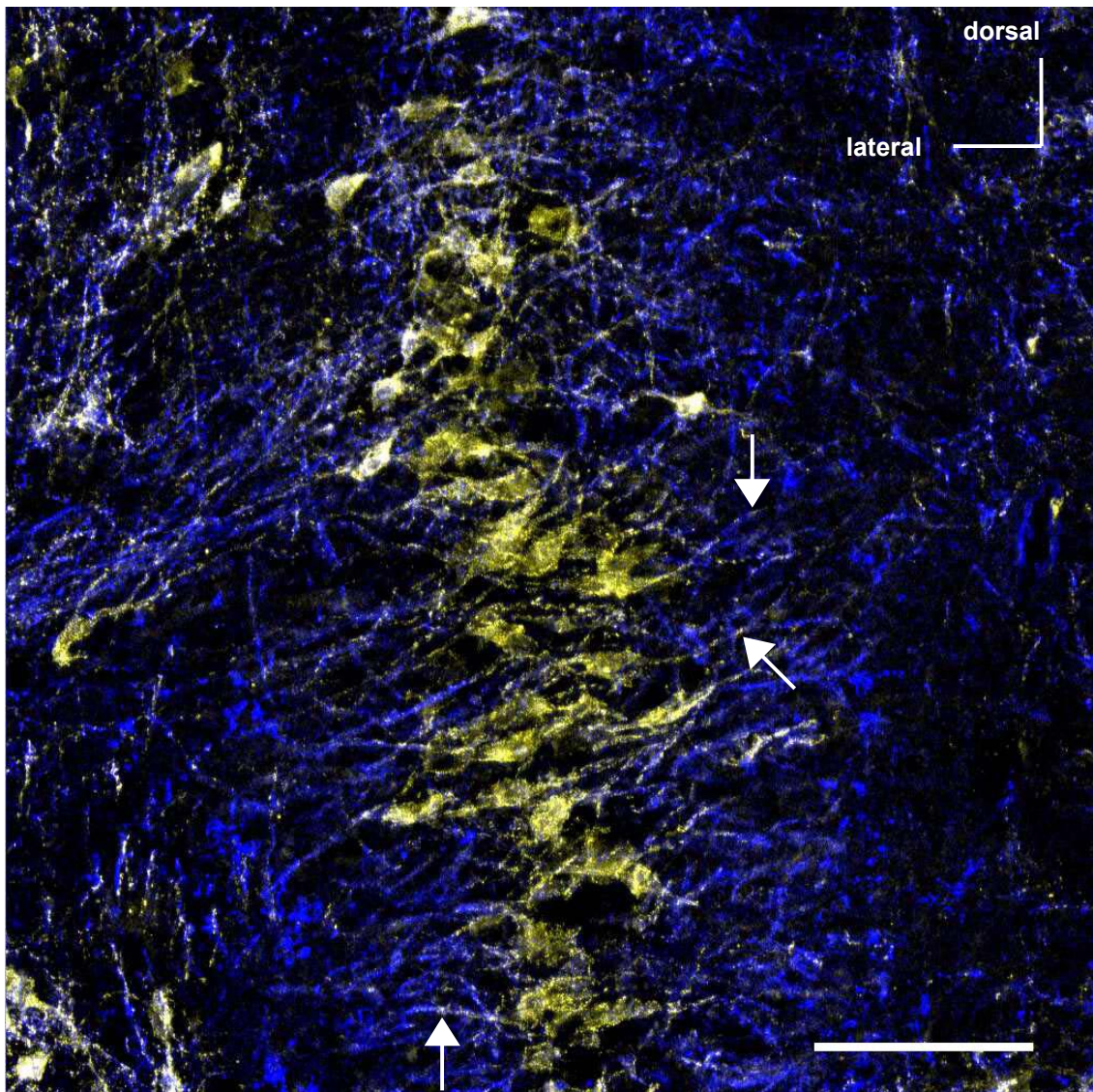


Abbildung 26 MAP2-/Glyzinrezeptorfärbung einer Wüstenrennmaus MSO

MSO einer adulten Wüstenrennmaus, gefärbt mit Antikörper gegen MAP2 (blau) und Glyzinrezeptor (gelb). Teilweise sind die sich nach medial und lateral erstreckenden Dendriten zu erkennen. Die gelbe Färbung des Glyzinrezeptors ist vor allem am Zellsoma prominent, teilweise aber auch noch weit entfernt vom Zellband zu sehen (Pfeile). Maßstab 100 μ m.

In Abbildung 27 ist die MSO Zelle eines normalen adulten Tieres und eines NRA-Tieres im Vergleich zu sehen. Wiederum sind die Dendriten blau (MAP2) und die Glyzinrezeptoren gelb (Glyzinrezeptorantikörper) gefärbt.

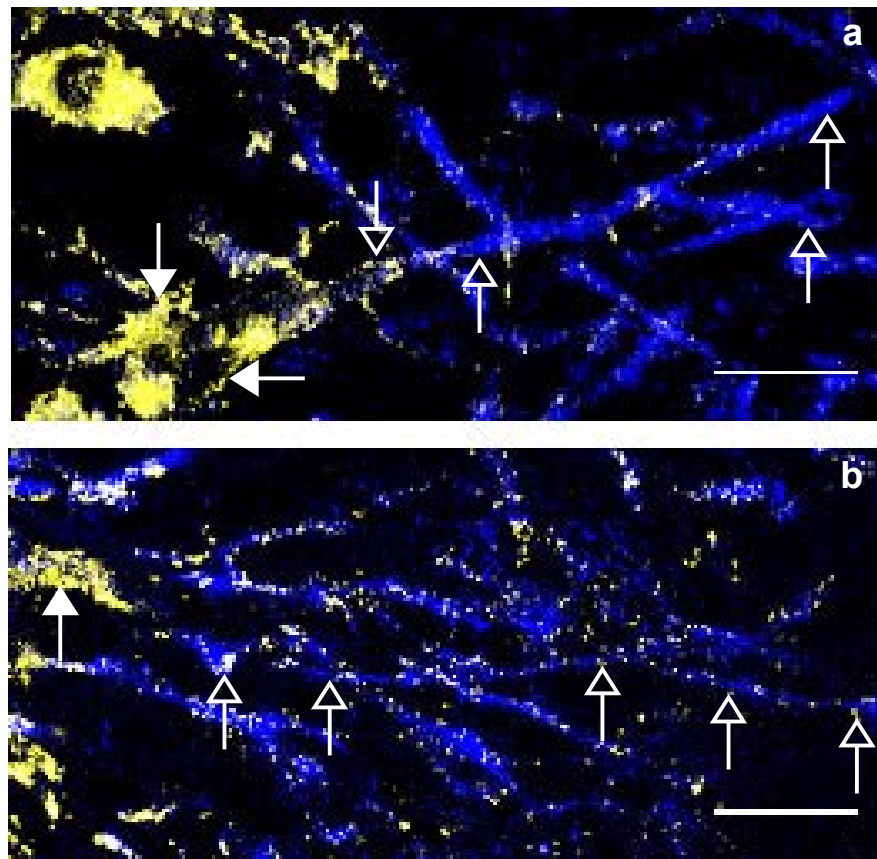


Abbildung 27 Vergleich von MSO-Zellen bei normaler und im Rauschen aufgewachsenen Wüstenrennmaus

a, MSO Zelle eines normalen adulten Tieres. Gut zu erkennen ist der durch MAP2 (blau) gefärbte Dendrit. Die gelbe Glyzinrezeptorfärbung ist auf dem Zellsoma deutlich vorhanden (voller Pfeil), auf dem proximalen und distalen Dendriten jedoch praktisch nicht (offene Pfeile). **b**, Die MSO-Zelle einer im Rauschen aufgewachsenen Wüstenrennmaus zeigt eine hohe Dichte an Glyzinrezeptoren auf dem Soma (voller Pfeil) aber auch eine hohe Dichte an Glyzinrezeptoren auf den proximalen und distalen Dendriten (offene Pfeile). Maßstab 20 μm . Bild in **a** von Christoph Kapfer (Kapfer et al., 2002).

Durch die starke gelbe Färbung am linken Bildrand von beiden Abbildungen kann man die Umrisse eines Zellsomas teilweise identifizieren (ausgefüllte Pfeile). Die Dendriten (im Bild von links nach rechts ziehend) sind klar mit MAP2 gefärbt (offene Pfeile). Bei der MSO-Zelle des normal aufgewachsenen adulten Tieres (Abbildung 27a) beschränkt sich die Glyzinrezeptorfärbung vor allem auf das Soma. Auf den proximalen und distalen Dendriten ist fast keine Glyzinrezeptorfärbung zu sehen. Ein anderes Bild ergibt sich hingegen an der MSO-Zelle des in weißem Rauschen aufgewachsenen Tieres (Abbildung 27b). Das Zellsoma ist wie in Abbildung 27a stark gelb gefärbt, jedoch ist die Dichte der Glyzinrezeptoren auf den proximalen und distalen Dendriten deutlich höher als im Kontrolltier.

In Abbildung 28 sind zwei weitere Beispiele einer MSO-Färbung aus einer anderen in der Rauschbox aufgezogenen Wüstenrennmaus gezeigt. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen MAP2 und Glyzinrezeptor gefärbt. In beiden Bildern lässt sich die hohe Glyzinrezeptordichte auf den Dendriten feststellen.

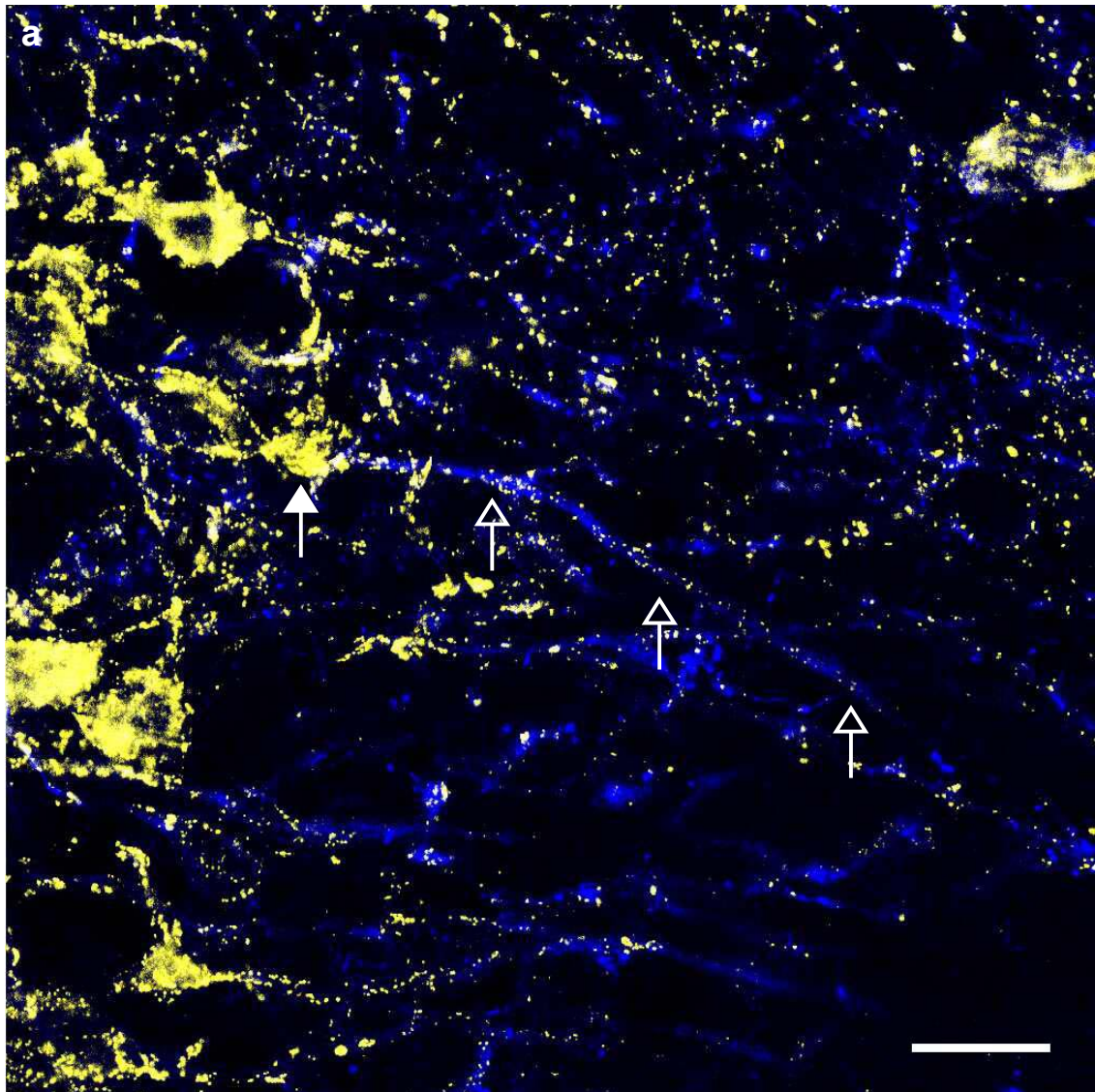


Abbildung 28a. Erklärung siehe nächste Seite.

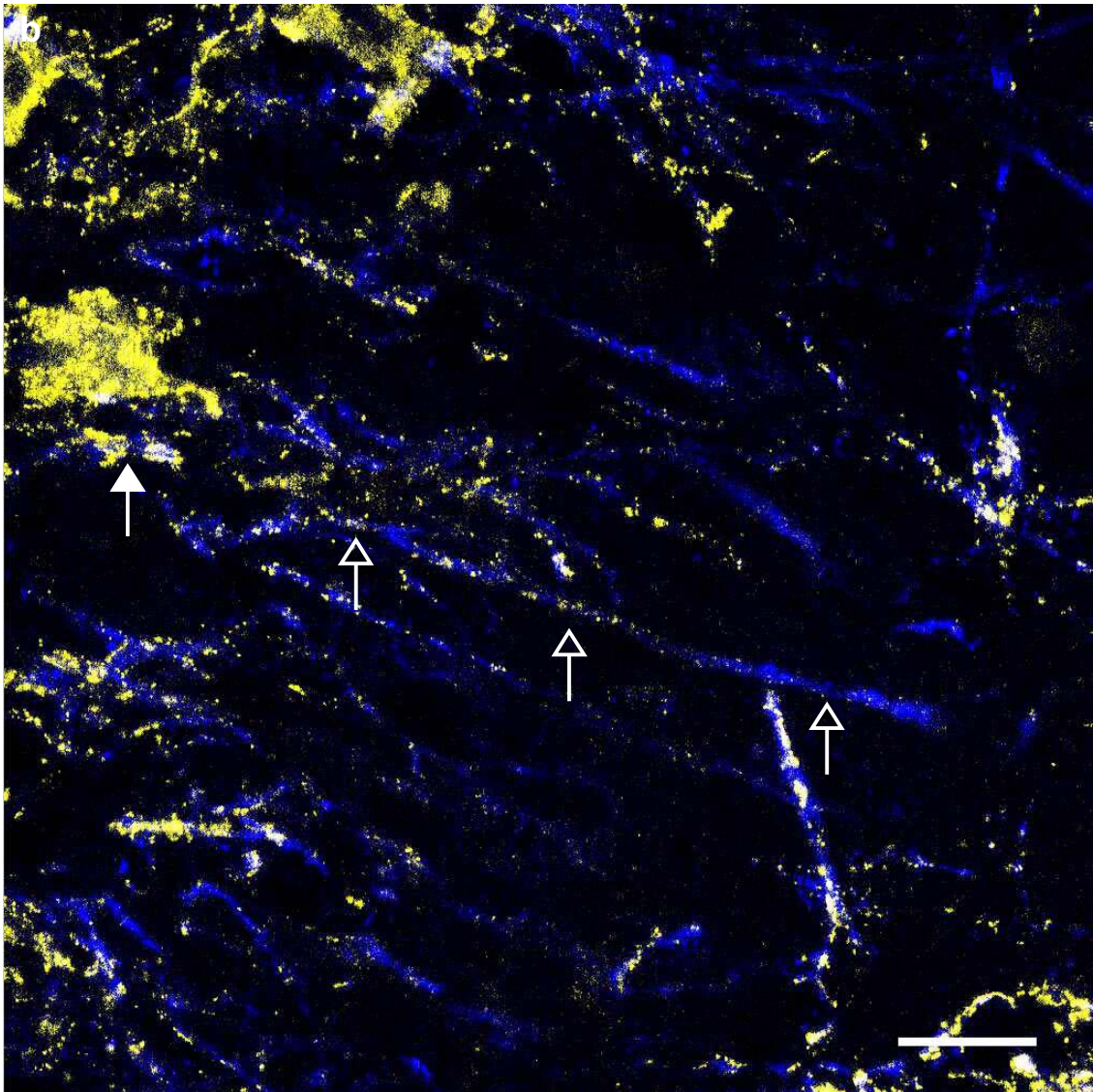


Abbildung 28 MSO-Zellen mit hoher Glyzinrezeptordichte auf dem Dendriten

a und **b**, Das Soma beider Zellen zeigt eine hohe Dichte an Glyzinrezeptoren (gelbe Färbung, voller Pfeil). Ebenso findet sich Glyzinrezeptorfärbung bis weit in die distalen Dendriten (offene Pfeile). **b**, Der Dendrit ist nicht vollständig erhalten, dennoch wird deutlich, dass er weit entfernt vom Bereich der Somata ist. Maßstab 20 μm .

Neben MAP2 wurde auch SMI32 zur Sichtbarmachung von Dendriten verwendet. SMI32 färbt allerdings nicht nur Dendriten, sondern auch neuronale Zellkörper und dicke Axone. In Abbildung 29 ist die MSO einer im Rauschen aufgewachsenen Wüstenrennmaus dargestellt. Das Zellband mit den Zellkörpern ist durch den hohen Anteil an der in rosa dargestellten Glyzinrezeptorfärbung erkennbar.

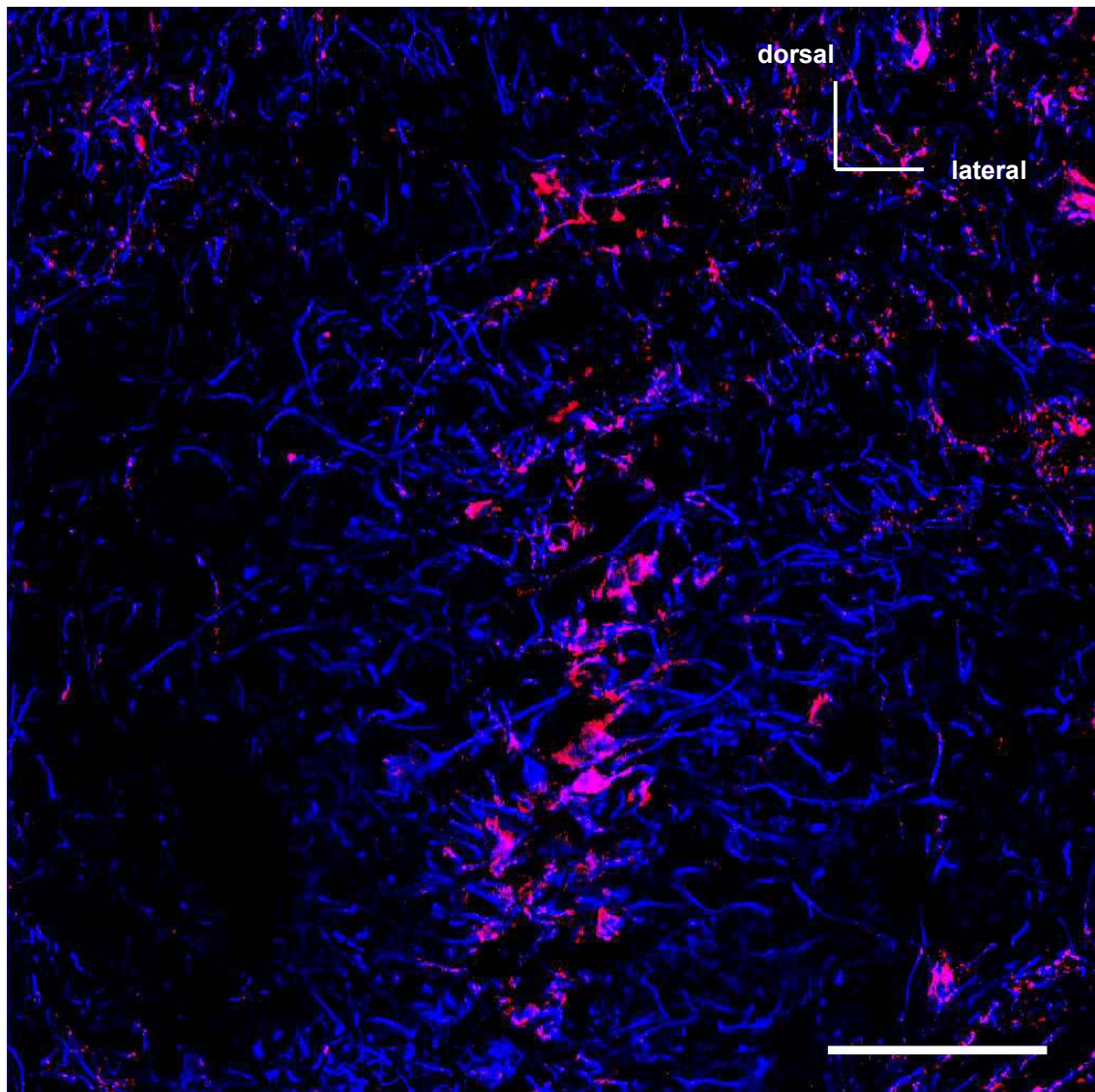


Abbildung 29 MSO einer im Rauschen aufgewachsenen Wüstenrennmaus

Die abgebildete MSO einer im Rauschen aufgewachsenen Wüstenrennmaus wurde mit Antikörpern gegen Glyzinrezeptor (rosa) und SMI32 (blau) gefärbt. Man erkennt das Zellband sowie die Färbung von Glyzinrezeptoren. Maßstab 100 μ m.

Bei Aufnahmen von einzelnen Zellen lässt sich die Verteilung der glyzinrezeptorpositiven Punkte feststellen. Abbildung 30 zeigt ein Beispiel einer MSO-Zelle aus dem gleichen Tier wie in Abbildung 29. Das Soma dieser Zelle (volle Pfeile) ist nicht mehr intakt. Lateral und medial erstrecken sich Dendriten. Es lassen sich einzelne glyzinrezeptorpositive Punkte auf dem Zellsoma ausmachen. Einzelne gefärbte Glyzinrezeptorpunkte sind auf den distalen Dendriten zu sehen (offene Pfeile). Das Erscheinungsbild dieser MSO unterscheidet sich in bezug auf das Dendritenfeld

von der Färbung in Abbildung 26. Diese Unterschiede sind vermutlich auf die verschiedenen Färbungsprozesse zurückzuführen.

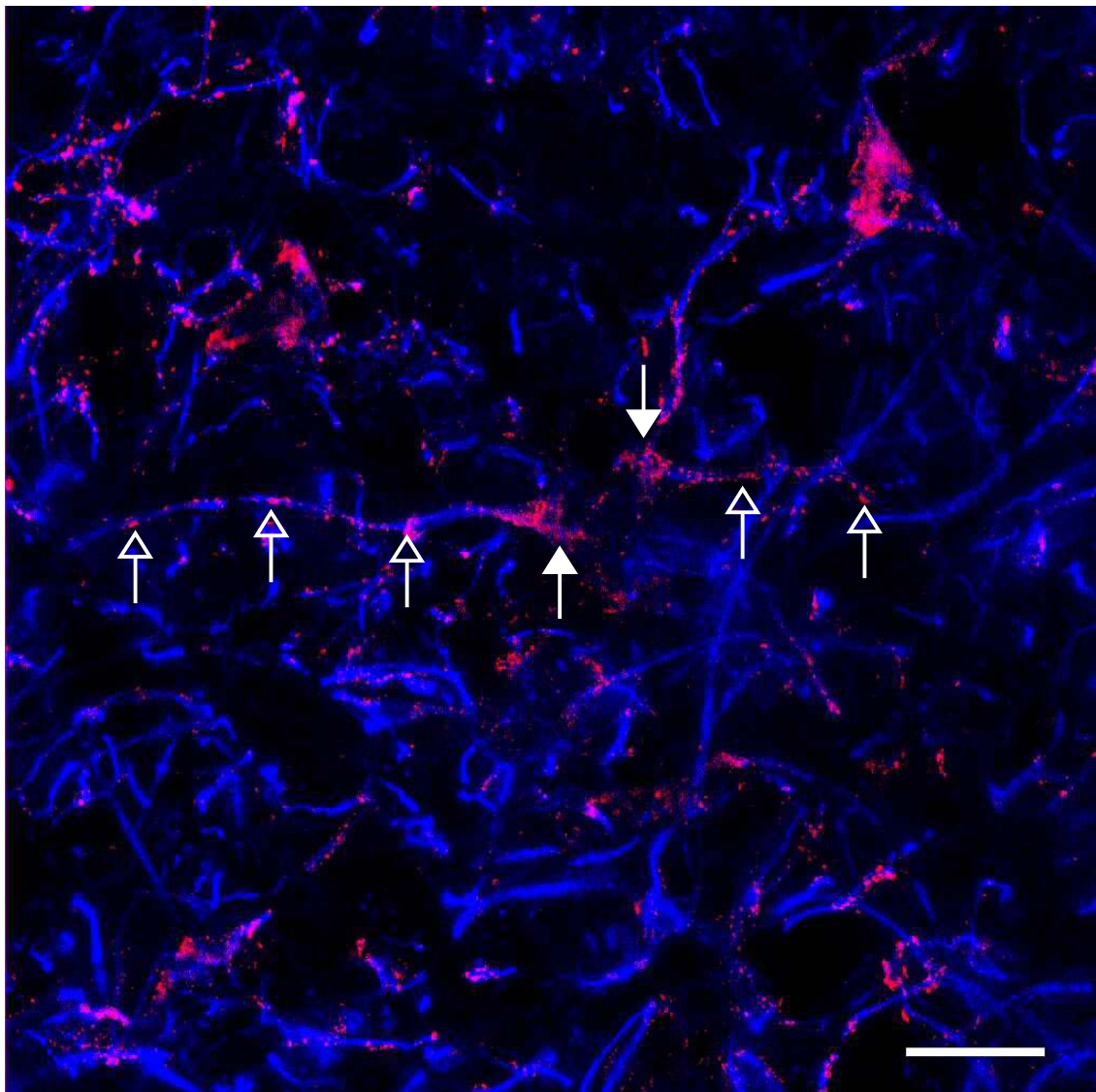


Abbildung 30 Einzelne MSO-Zelle einer Noisebox-Wüstenrennmaus

MSO Zelle gefärbt mit Glyzinrezeptor (rosa) und SMI32 (blau) Antikörper. Die Zelle scheint in der Mitte des Somas zerrissen (volle Pfeile). Vor allem an dem sich nach links erstreckenden Dendriten ist die Glyzinrezeptorfärbung erkennbar (offene Pfeile). Maßstab 20 μ m.

Abbildung 31 zeigt ebenfalls eine MSO-Zelle eines Noisebox Tieres. Von diesem Neuron erstrecken sich nicht nur Dendriten nach medial und lateral, sondern auch nach ventral. Außerdem ist ein nach dorsal ziehendes Axon zu erkennen. Die Anordnung der Dendriten bietet Grund zu der Annahme, dass es sich bei dieser Zelle um eine ‚non-principal cell‘ handelt.

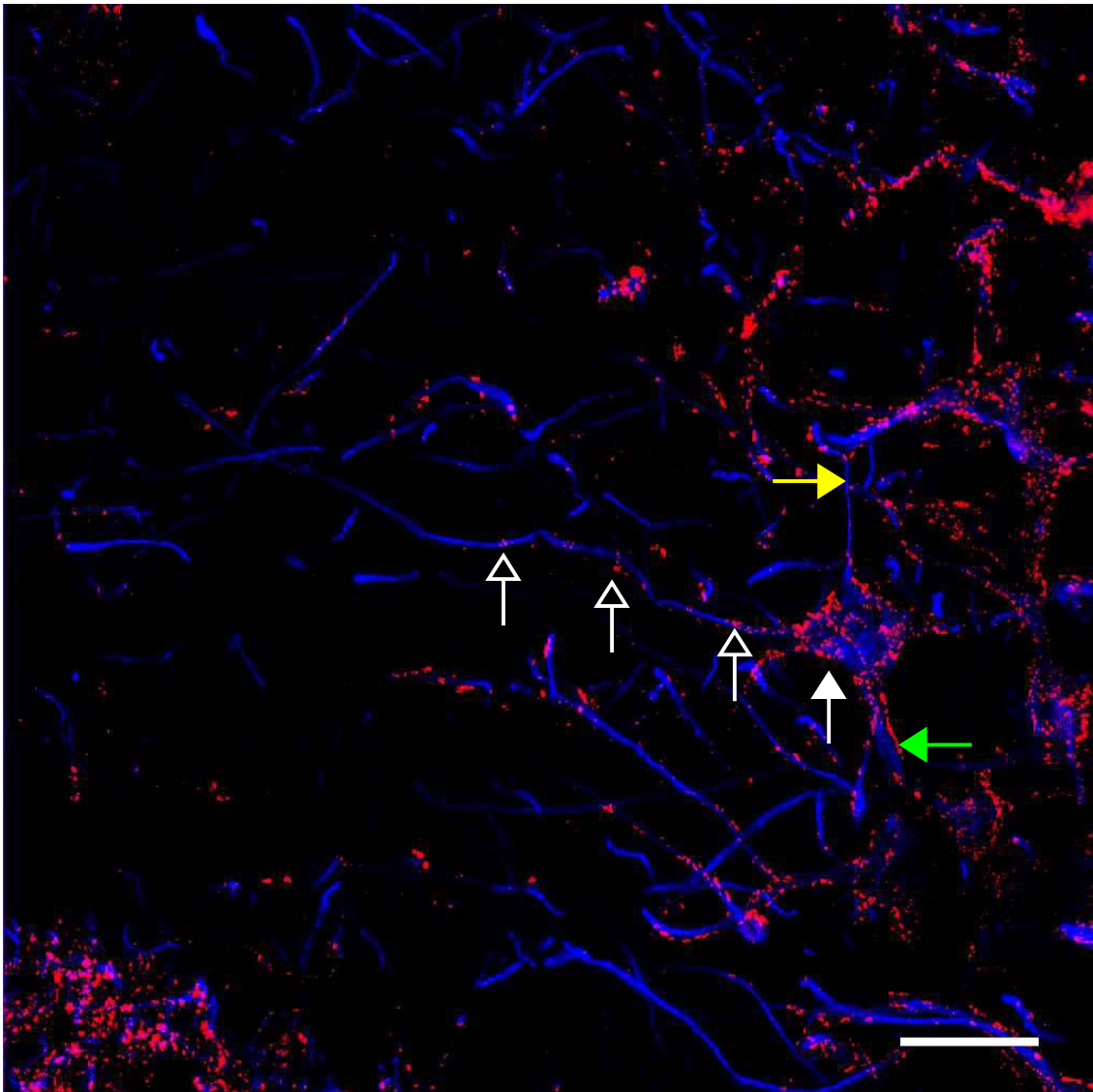


Abbildung 31 Einzelne MSO-Zelle eines Noisebox Tieres

In der Abbildung ist eine MSO-Zelle einer im Rauschen aufgezogenen Wüstenrennmaus gegen SMI32 (blau) und Glyzinrezeptor (rosa) gefärbt. Auf dem Zellsoma sind einzelne spezifische glyzinrezeptorpositive Punkte auszumachen (weißer Pfeil). Entlang der proximalen und distalen Dendriten sind deutlich Glyzinrezeptorpunkte zu erkennen (offene Pfeile). Nach dorsal erstreckt sich vom Soma ein dünner Fortsatz, der einem Axon zuzuschreiben ist (gelber Pfeil). Außerdem besitzt diese Zelle nicht nur Dendriten nach lateral und medial, sondern auch noch einen Dendriten, der nach ventral zeigt und ebenfalls glyzinrezeptorpositive Punkte besitzt (grüner Pfeil). Maßstab 20 μ m.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Aufzucht von Wüstenrennmäusen von P10 bis P25 die Beschränkung der glyzinergen Synapsen auf das Soma zu einem gewissen Maß unterdrückt.

4.1.2 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN

Um Hinweise auf die Funktionalität der glyzinerger Synapsen auf den Dendriten von in Rauschexposition aufgezogenen Wüstenrennmäusen zu erhalten, wurden durch Gephyrin identifizierte Synapsen auf ihre Kolokalisation mit präsynaptischen Axonterminalen hin untersucht. Gephyrin ist ein Verankerungsprotein von Glyzin- und GABA-Rezeptoren und tritt nur postsynaptisch an inhibitorischen Synapsen auf (Kneussel and Betz, 2000). Dazu wurden mit Gephyrinantikörper gefärbte MSO-Zellen von im Rauschen aufgezogenen Wüstenrennmäusen elektronenmikroskopisch untersucht.

Abbildung 32 zeigt den Querschnitt eines Dendriten einer MSO-Zelle von einer Wüstenrennmaus aus einem Noiseboxversuch. Der Dendrit (D) ist von vier Axonterminalen (AT) umgeben, und im Dendriten, sowie in den Axonterminalen sind zahlreiche Mitochondrien zu erkennen (Beispiel: grüner Pfeil). In den Axonterminalen finden sich zahlreiche Vesikel (blauer Pfeil) und an einigen angeschnittenen Axonen treten die Myelinscheiden dunkel hervor (roter Pfeil). Zwei dieser Terminalien sind durch die Markierung von postsynaptischem Gephyrin als inhibitorische Synapsen identifizierbar.

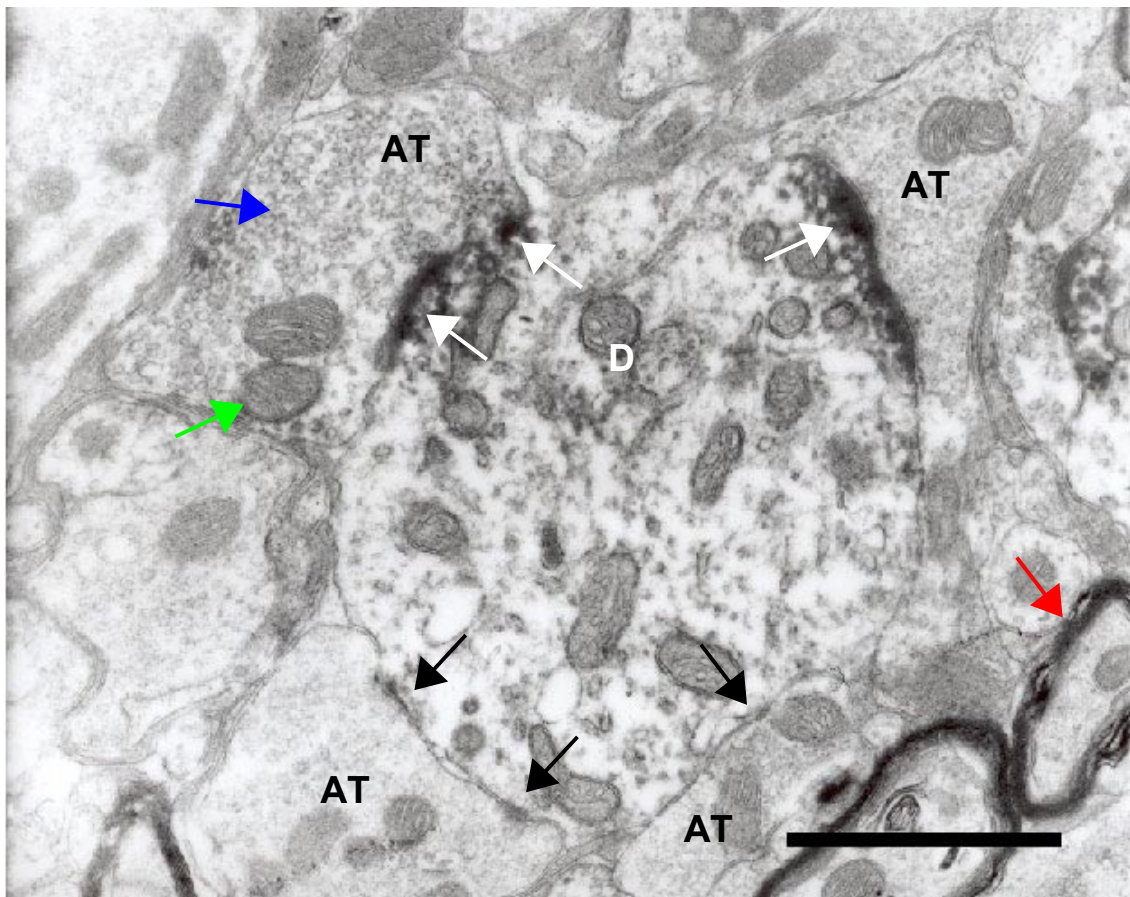


Abbildung 32 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dendritenquerschnitts

Querschnitt durch den Dendriten einer MSO-Zelle einer im Rauschen aufgewachsenen Wüstenrennmaus. Die inhibitorischen Synapsen sind durch Antikörper gegen postsynaptisches Gephyrin sichtbar gemacht (dunkle Färbung). Der Dendrit (D) ist zu allen Seiten von Axonterminalen (AT) umschlossen. Inhibitorische (weiße Pfeile) und exzitatorische Synapsen (schwarze Pfeile) sind gleichermaßen vorhanden. Im Gegensatz zu den exzitatorischen Synapsen ist die postsynaptische Seite der inhibitorischen Synapsen durch Gephyrin deutlich schwarz gefärbt. Interessant ist die inhibitorische Synapse links oben, die in zwei postsynaptische Verdichtungen endet. Maßstab 1 μ m.

In Abbildung 33 sind zwei angeschnittene Zellkörper der MSO eines Noiseboxtieres zu sehen. Eine große Anzahl der Synapsen ist auch hier glyzinerg. An den durch schwarze Anti-Gephyrinfärbung identifizierten inhibitorischen Synapsen sind präsynaptische Axonterminale vorhanden.

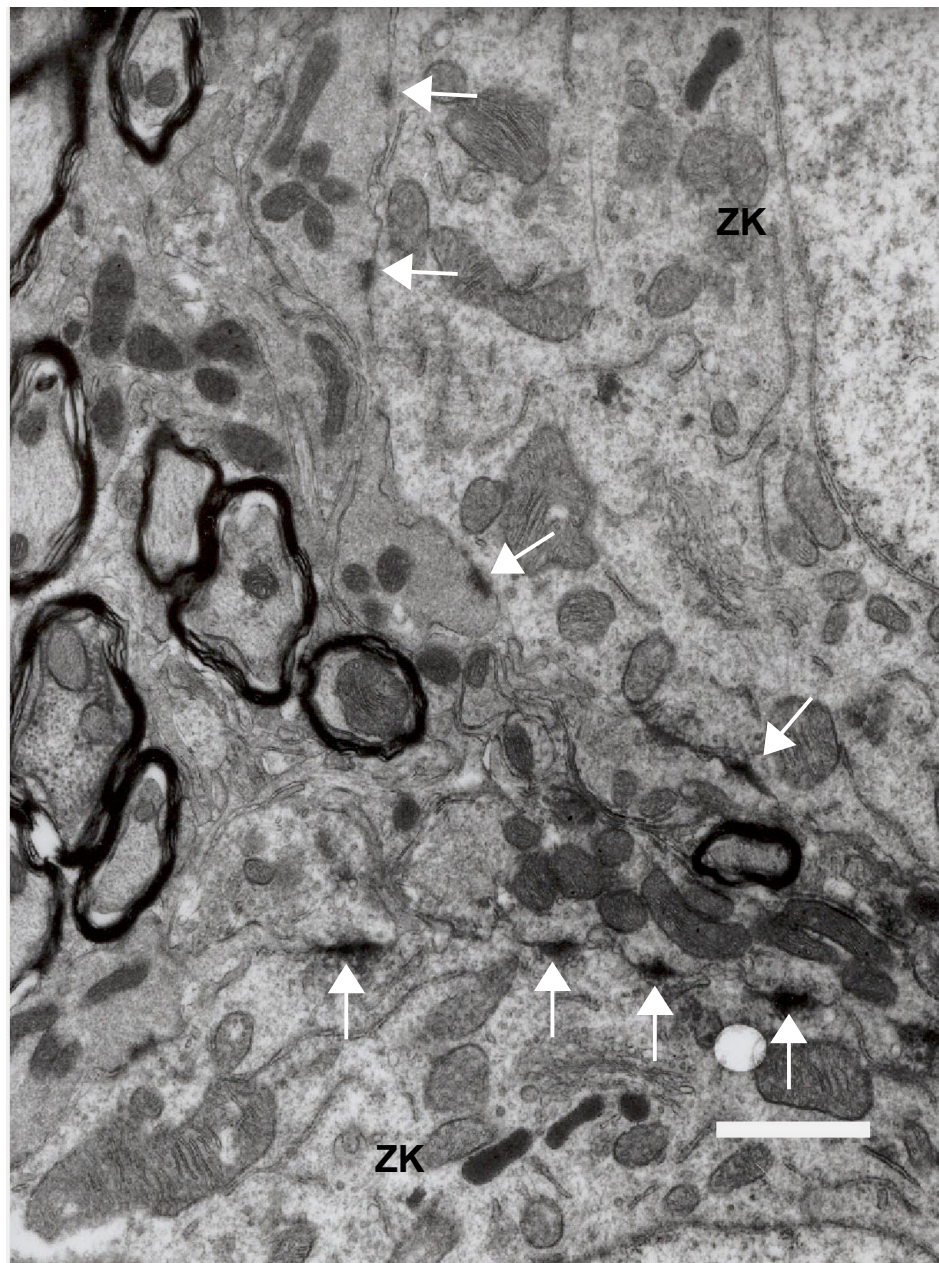


Abbildung 33 Elektronenmikroskopische Aufnahme zweier MSO-Zellkörper

Querschnitte durch zwei Zellkörper (ZK) einer elektronenmikroskopischen Aufnahme einer Wüstenrennmaus MSO. Weiße Pfeile kennzeichnen inhibitorische Synapsen, die durch die schwarz erscheinende Anti-Gephyrinfärbung identifiziert werden. Maßstab 1 μm .

Ein Querschnitt durch zwei Dendriten ist in Abbildung 34 zu sehen. Die durch die DAB-Färbung schwarz markierten Gephyrinproteine zeigen, dass ein großer Teil der Synapsen beider Dendriten auch hier glyzinerg ist. Der Ausschnitt von Abbildung 34 zeigt die Vergrößerung einer glyzinergen Synapse. Auf der präsynaptischen Seite erkennt man die zu einer dichten Matrix zusammengefassten Vesikel.

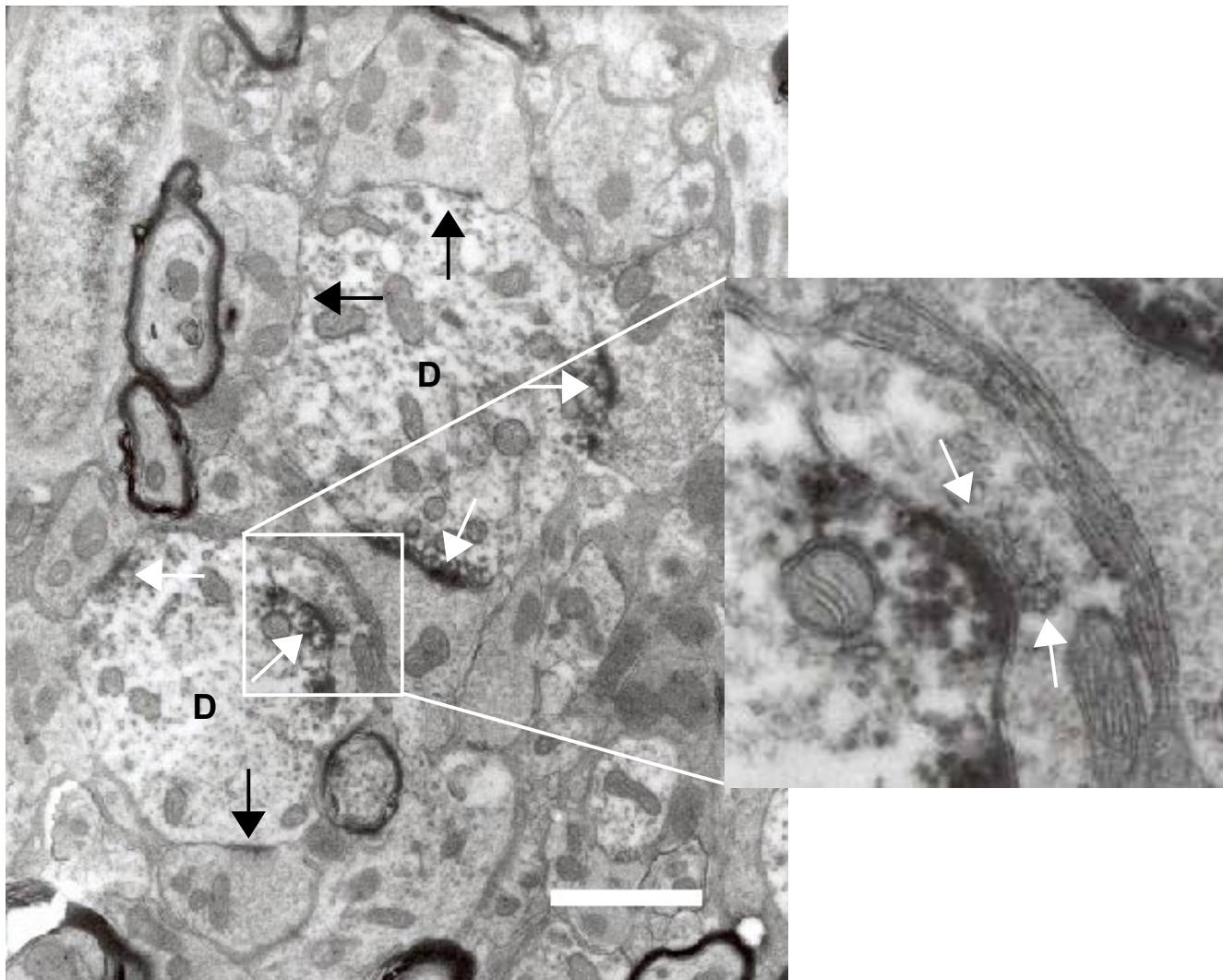


Abbildung 34 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von zwei Dendriten

Die Abbildung zeigt die Querschnitte durch zwei Dendriten einer unter Rauscheinfluss aufgewachsenen Wüstenrennmaus. Beide Dendriten sind von Axonterminalen umgeben. Inhibitorische Synapsen (weiße Pfeile), identifiziert durch schwarze Gephyrinfärbung, und exzitatorische Synapsen (schwarze Pfeile) sind gleichermaßen vorhanden. Der Bildausschnitt zeigt die Vergrößerung einer inhibitorischen Synapse. Deutlich erkennbar sind die zu einer dichten Matrix zusammengefassten Vesikel. Maßstab 1 μ m.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen belegen somit, dass die an Dendriten der MSO-Zellen von Noisebox Tieren gefundenen glyzinergen Synapsen mit präsynaptischen Axonterminalen verbunden sind.

4.1.3 QUANTIFIZIERUNG DER VERTEILUNG

Für eine quantitative Aussage über die Verteilung der inhibitorischen Eingänge an den MSO-Zellen der im Rauschen aufgewachsenen Wüstenrennmäuse wurde die Dichte der Glyzinrezeptoren im Verhältnis zum Abstand vom Soma bestimmt. Abbildung 35 zeigt

die Verteilung der glyzinrezeptorpositiven Punkte auf einzelnen Dendritenabschnitten als Funktion zum Somaabstand. Die Dendriten wurden in Abschnitte von 20 μm unterteilt und die Punktedichte auf die relativ höchste Dichte im proximalsten Abschnitt normalisiert. Es wurden MSO-Zellen von drei verschiedenen Gruppen von Wüstenrennmäusen verglichen. Normale adulte Tiere zeigten eine starke Abnahme der Glyzinrezeptordichte mit zunehmender Entfernung vom Soma. Die Häufigkeit an Glyzinrezeptoren ist dabei bereits im zweiten Dendritenabschnitt bis auf fast 50 % reduziert. Zwischen 120 und 140 μm Abstand vom Soma betrug die Dichte nur noch weniger als ein Zehntel des ersten Abschnittes. An Dendriten der MSO Zellen von Tieren, die in omnidirektionalem Rauschen aufgezogen wurden, war die relative Glyzinrezeptordichte entlang der gesamten Dendritenlänge, normalisiert zum proximalsten Dendritenabschnitt (siehe 3.3.8), gegenüber normalen adulten Tieren signifikant erhöht (Abbildung 35; Mann-Whitney U Test, $P < 0.002$). Im Vergleich zur Cochleablation unterdrückt das omnidirektionale weiße Rauschen die Restriktion der inhibitorischen Eingänge jedoch weitaus geringer. Die Daten von normalen Tieren und vertäubten Tieren wurden von Christoph Kapfer ermittelt (vgl. Kapfer et al., 2002).

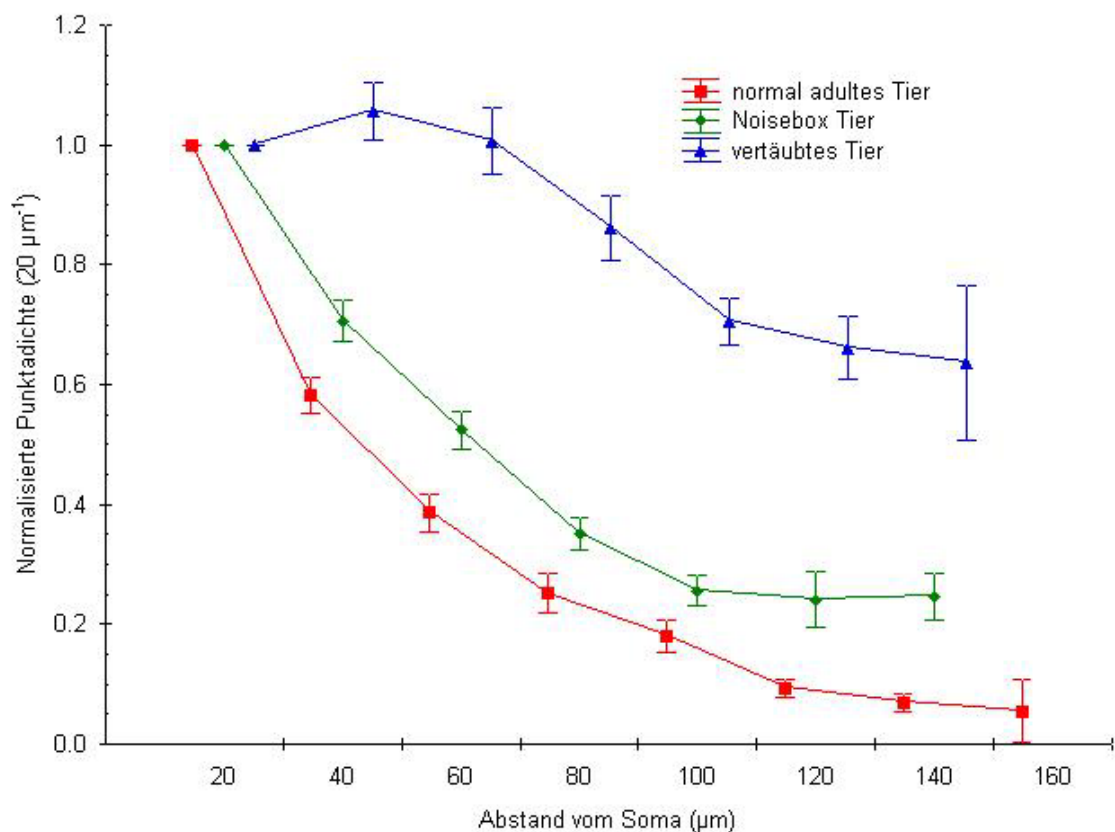


Abbildung 35 (vorherige Seite) Vergleich der Verteilung von Glyzinrezeptoren

An den MSO-Neuronen der im Rauschen aufgewachsenen Tiere ist die Dichte an glyzinerger Synapsen an den Dendriten im Vergleich zu normalen adulten Tieren signifikant erhöht. Die Dichte bleibt jedoch hinter dem Wert der vertäubten Tiere zurück. (Daten der normalen adulten Tiere und der vertäubten Tieren wurden durch Christoph Kapfer ermittelt, vgl. Kapfer et al., 2002).

4.2 VERTEILUNG GLYZINERGER SYNAPSEN AN MSO-ZELLEN DER RATTE

Die inhibitorischen Synapsen an den MSO-Zellen der Wüstenrennmaus, einem Tier das interaurale Zeitdifferenzen verarbeitet, zeigen eine erfahrungsabhängige Entwicklung und Umverteilung. Wenn diese Entwicklung eine funktionelle Bedeutung für die ITD-Kodierung hat, sollte man sie bei Tieren, die nur im hochfrequenten Bereich hören und bei denen die ITD-Auswertung somit keine Rolle spielt, nicht erwarten. Daher untersuchten wir die Verteilung von glyzinerger Rezeptoren an MSO Zellen der Ratte.

Um die Verteilung inhibitorischer Synapsen an MSO-Zellen bei der Ratte qualitativ nachzuweisen, wurden, wie bei der Wüstenrennmaus, Doppelfärbungen gegen Dendriten und Marker inhibitorischer Synapsen angefertigt. Zur Quantifizierung wurden MSO-Zellen mit Antikörpern gegen Gephyrin und Glyzin gefärbt.

4.2.1 QUALITATIVE VERTEILUNG DER GLYZINREZEPTOREN AN MSO-NEURONEN BEI DER RATTE

In Abbildung 36 ist die Anti-Gephyrin DAB-Färbung der rechten Hälfte des SOC einer Ratte zu sehen. Deutlich zu erkennen im rechten oberen Bildrand ist die LSO mit ihrer typischen S-förmigen Struktur. Medial der LSO befindet sich die viel kleinere MSO, an die medial der MNTB anschließt. Die MSO ist bei der Ratte nicht so ausgeprägt wie bei der Wüstenrennmaus. In dorso-ventraler Richtung erstreckt sich die MSO der Ratte nicht so weit, die MSO-Zellen erscheinen auch weit weniger regelmäßig und erstrecken sich nicht entlang der dorso-ventralen Achse in einem gegliederten Zellband angeordnet. Vor allem auf der ventralen Seite sind die Zellkörper breiter in medio-lateraler Richtung gestreut.

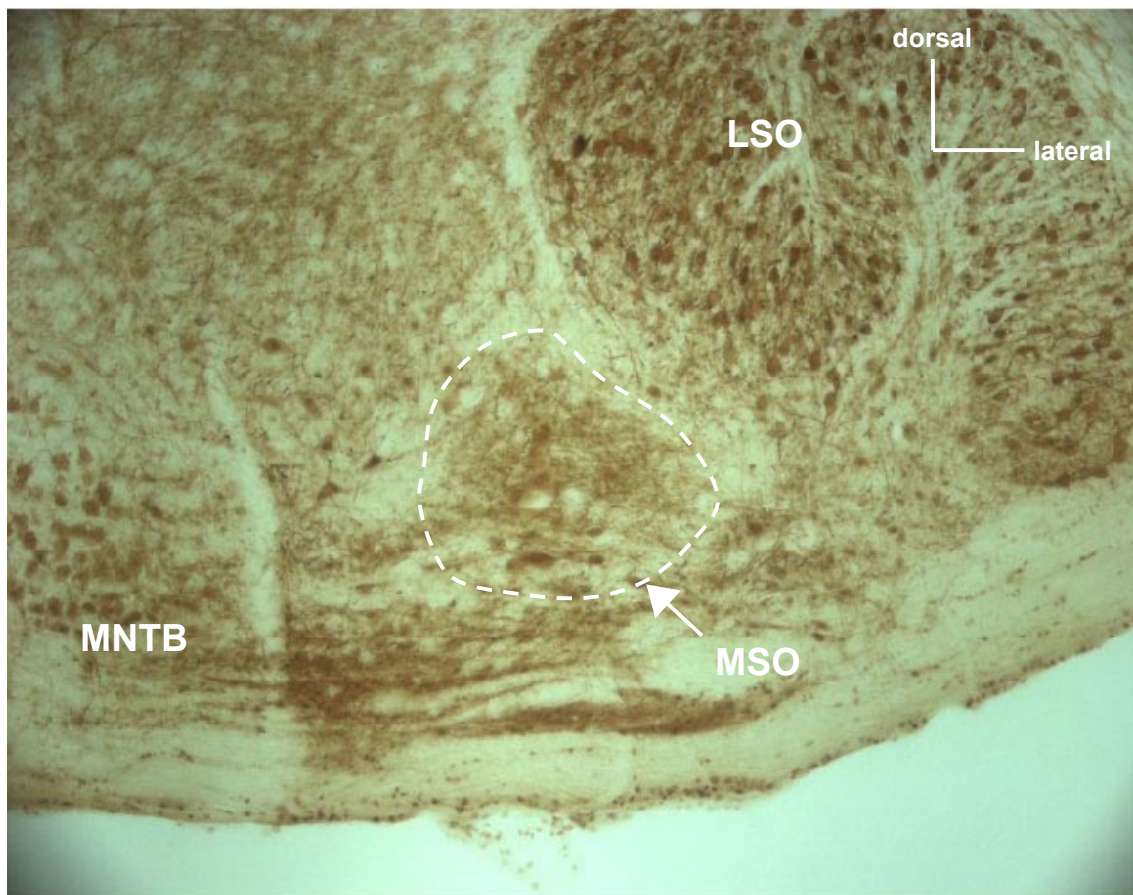


Abbildung 36 Anti-Gephyrin DAB-Färbung des SOC einer Ratte

Abgebildet ist die rechte Hälfte des SOC einer Ratte. Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen Gephyrin gefärbt. Die LSO ist im rechten Bildrand mit ihrer typischen S-förmigen Struktur gut zu erkennen. Medial der LSO befindet sich die MSO, die von Neuropil mit niedriger Dichte umrahmt wird. Die MSO ist hier weit weniger ausgeprägt als bei der Wüstenrennmaus und die einzelnen Zellen erscheinen auch weniger geordnet.

In Abbildung 37 ist die MAP2-Färbung der MSO einer Ratte zu sehen. Auch hier wird klar, dass die MSO der Ratte weniger strukturiert ist als die der Wüstenrennmaus (vgl. Abbildung 26). Die MSO hat durch ihre breitere Erscheinung ventral einen fast pyramidenförmigen Umriss. Rogowski und Feng (Rogowski and Feng, 1981) beschreiben die Existenz von bi- und multipolaren Neuronen in der MSO der Ratte. Die weiter unten gezeigten Beispiele einzelner MSO-Zellen entsprechen dem bipolaren Typ, über die Existenz anderer Zellarten kann jedoch keine Aussage gemacht werden, da für eine genaue Analyse die Anzahl der deutlich identifizierbaren Zellen zu gering ist.

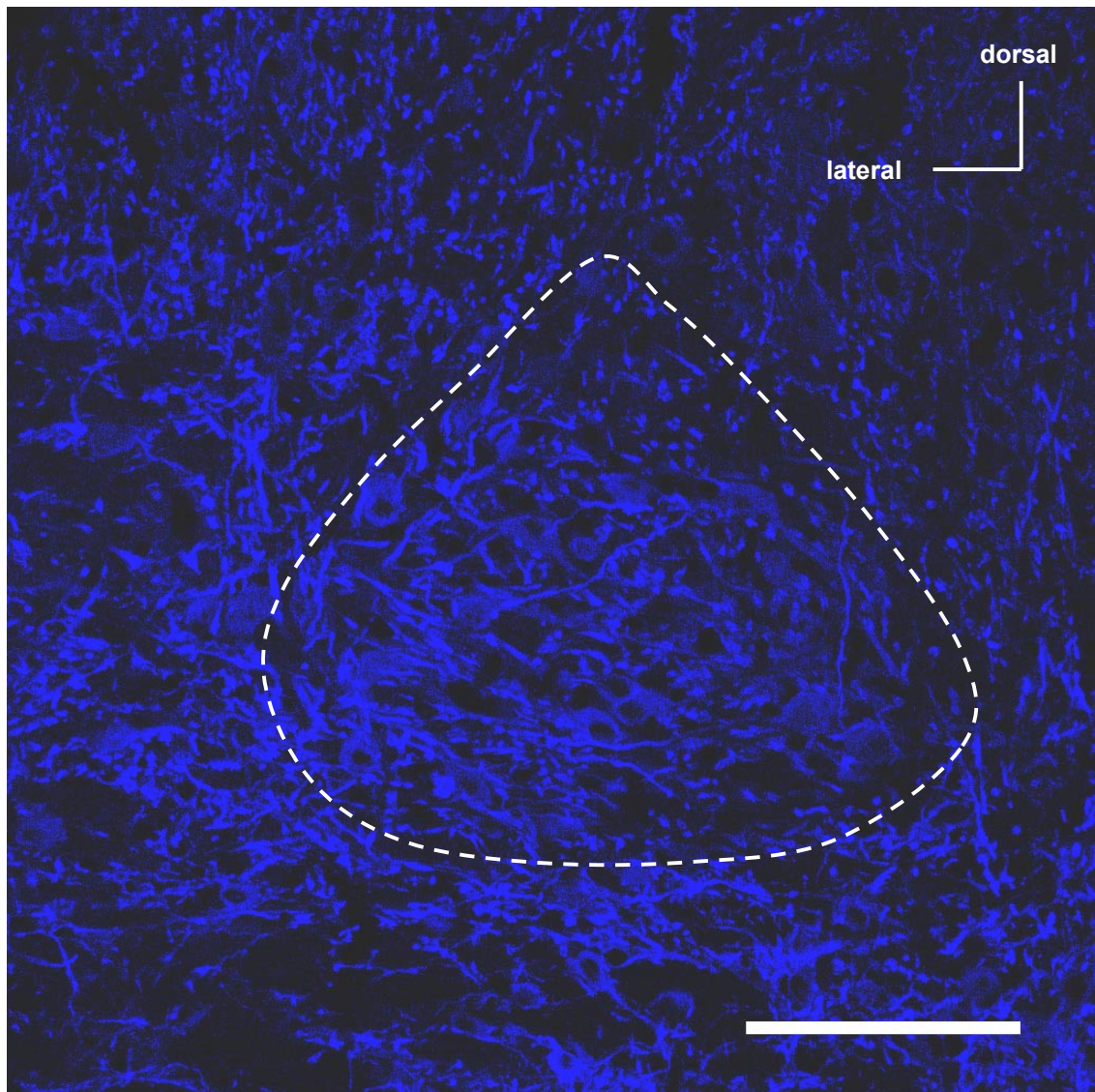


Abbildung 37 MAP2-Färbung der MSO einer Ratte

Zentral im Bild ist der Nukleus der MSO zu erkennen (gestrichelte weiße Linie). Dendriten und, etwas schwächer, Somata sind durch MAP2 gefärbt. Die MSO erscheint bei der Ratte weit ungeordneter als bei der Wüstenrennmaus, dennoch lassen sich einzelne Zellen mit ihren Dendriten erkennen. Maßstab 100 μm .

Die unregelmäßige Anordnung der MSO-Zellen bei der Ratte lässt schon vermuten, dass die Analyse einzelner Zellen sich weitaus schwieriger gestalten kann als bei der Wüstenrennmaus. Auf dieses Problem wird detailliert in 4.2.3 eingegangen.

An einzelnen MSO-Neuronen der Ratte sollte mit Doppelfärbung gezeigt werden, ob die inhibitorischen Eingänge gleichmäßig entlang des ganzen Dendriten verteilt sind, oder ob es Hinweise auf eine räumliche Beschränkung der glyzinergen Synapsen gibt. Abbildung 38a und b zeigen eine mit Antikörpern gegen MAP2 und Glyzinrezeptoren bzw. nur gegen Glyzinrezeptoren gefärbte MSO einer Ratte. Die

gelbe Glyzinrezeptorfärbung kennzeichnet deutlich einzelne Neurone. Die Zellen bilden am dorsalen Ende der MSO noch ein schmales Zellband, das aber nach ventral breiter wird.

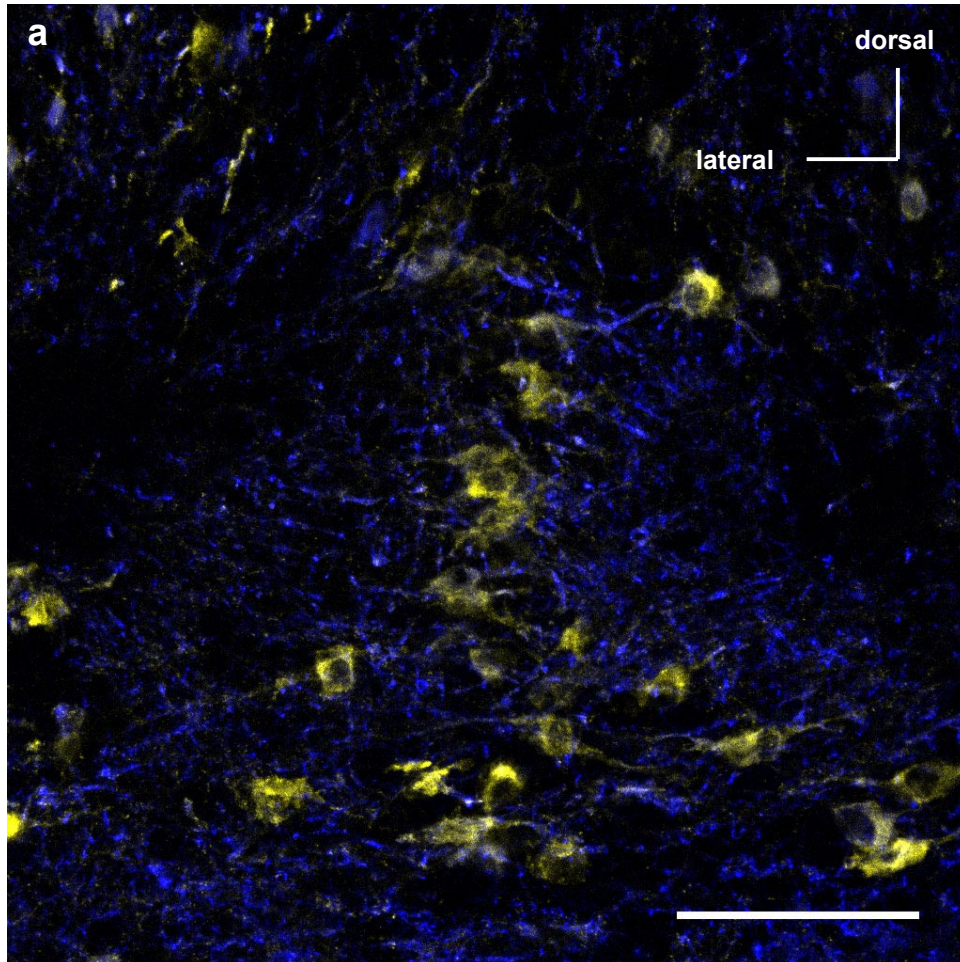


Abbildung 38a (Beschreibung nächste Seite)

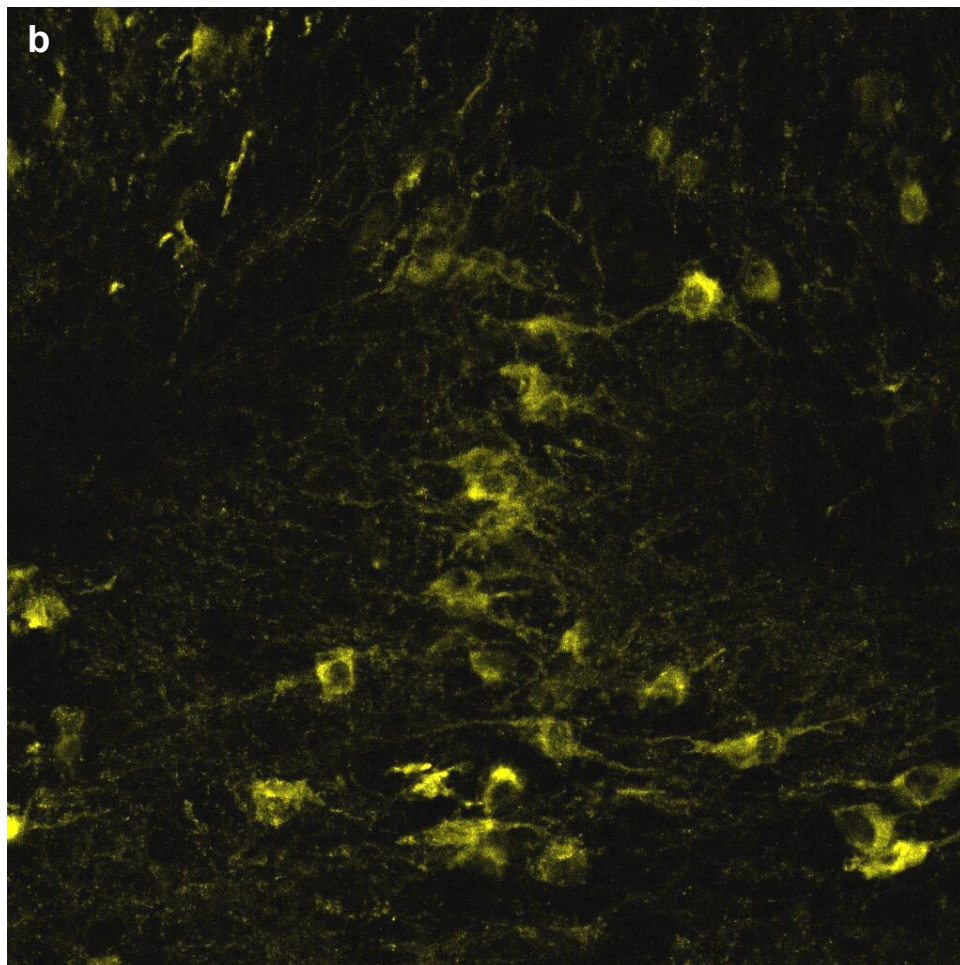


Abbildung 38 MAP2-/Glyzinrezeptorfärbung der MSO einer Ratte

a, Die abgebildete MSO einer Ratte wurde mit Antikörper gegen MAP2 (blau) und Glyzinrezeptoren (gelb) gefärbt. Die Zellen erscheinen dorsal noch mehr oder weniger zu einem Zellband angeordnet, das aber nach ventral immer breiter wird. **b**, Die gleiche Aufnahme nur ohne die MAP2-Färbung. Dabei wird die Verteilung der Glyzinrezeptoren entlang der Dendriten deutlicher. Maßstab 100 μm .

Neben dem weniger strukturierten Zellband erscheinen auch die Dendriten weniger geordnet als bei der Wüstenrennmaus.

Die Verteilung der glyzinergen Synapsen an MSO-Zellen der Ratte ist gut an den beiden in Abbildung 39 gezeigten Beispielen zu erkennen. Beide Zellen sind mit Antikörpern gegen MAP2 und gegen Gephyrin bzw. Glyzinrezeptor gefärbt.

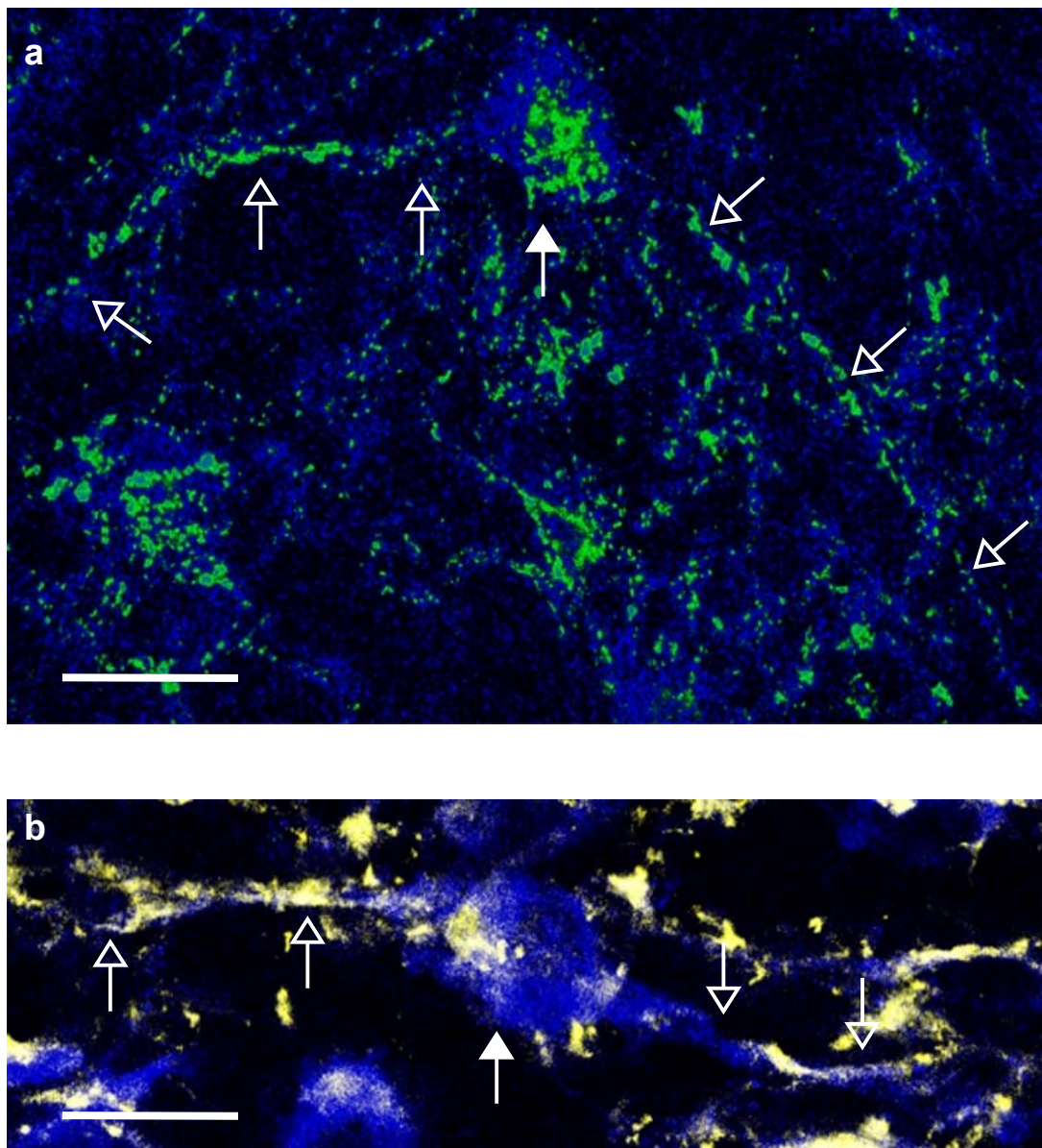


Abbildung 39 Qualitative Verteilung von glyzinergen Synapsen an MSO-Zellen der Ratte

a, MSO Neuron mit MAP2- (blau) und Gephyrinfärbung (grün). Sowohl am Soma (voller Pfeil), als auch an den proximalen und distalen Dendriten (offene Pfeile) findet sich Markierung für Gephyrin. **b**, MSO-Neuron gefärbt mit Antikörpern gegen MAP2 (blau) und Glyzinrezeptor (gelb). Auch hier findet sich eine hohe Dichte an glyzinergen Synapsen auf Soma, proximalen und distalen Dendriten. Maßstab 20 μ m

Bei beiden Zellen lässt sich die Färbung für Gephyrin bzw. Glyzinrezeptor auf den Somata und den proximalen und distalen Dendriten erkennen. Die glyzinergen Synapsen erscheinen also gleichmäßig entlang der Dendriten verteilt zu sein.

Bei einem weiteren Beispiel wurden MSO Zellen mit SMI32- und Glyzinrezeptorantikörper angefärbt (siehe Abbildung 40). Auch hier ist die Färbung von Glyzinrezeptoren bis weit in die distalen Dendriten zu verfolgen.

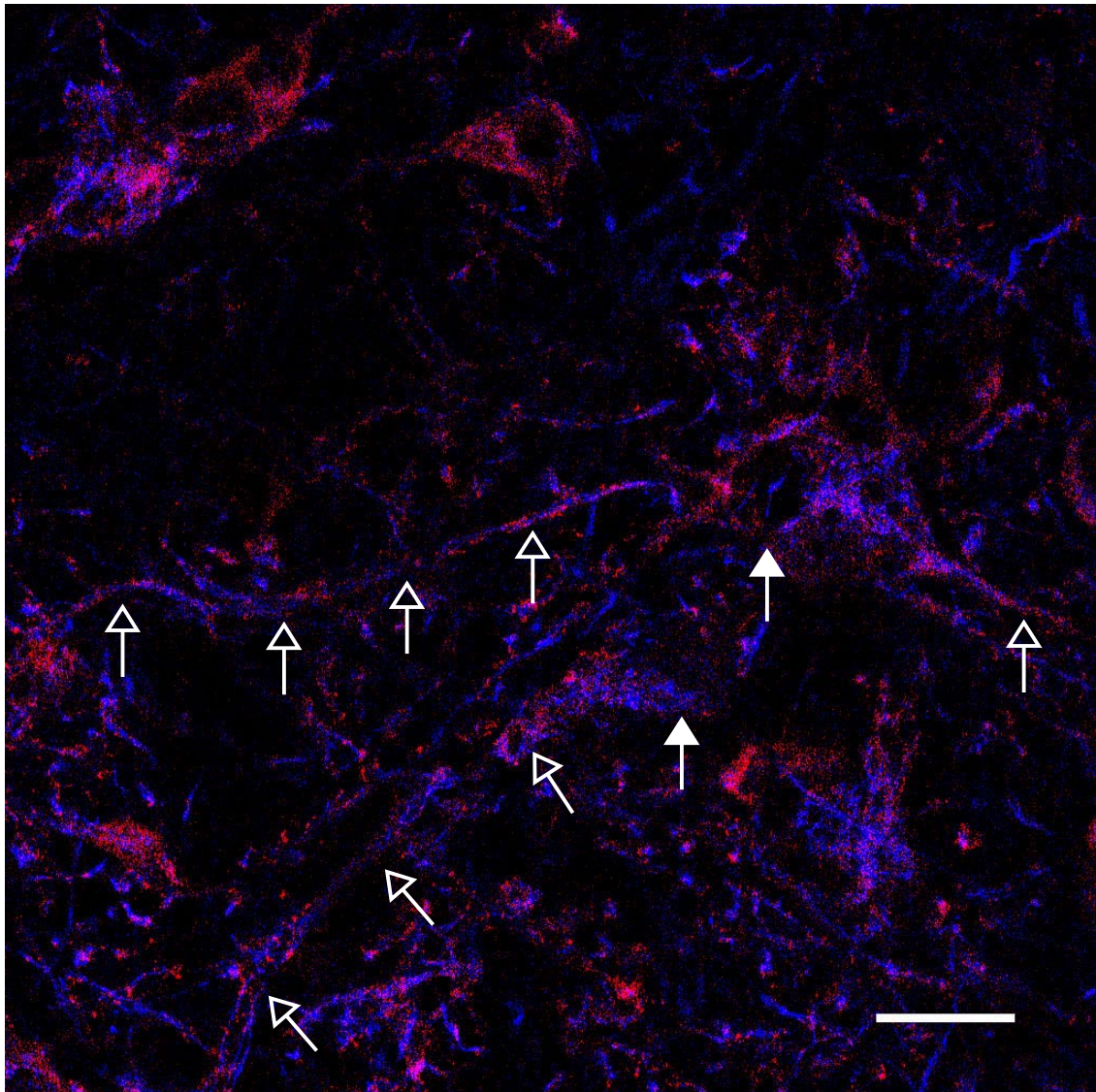


Abbildung 40 SMI32-/Glyzinrezeptorfärbung einer MSO-Zelle der Ratte

Die Abbildung zeigt zwei MSO-Zellen, an denen durch Antikörperfärbung SMI32 (blau) und Glyzinrezeptoren (rosa) sichtbar gemacht wurden. Neben den Somata (volle Pfeile) sind auch die Dendriten (offene Pfeile) zu erkennen. Die Glyzinrezeptoren sind hier gleichmäßig auf Soma, proximalen und distalen Dendriten zu finden. Maßstab 20 µm

4.2.2 ENTWICKLUNGSABHÄNGIGE VERTEILUNG VON GLYZINREZEPTOREN AN MSO-ZELLEN DER RATTE

Der folgende Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Christoph Kapfer angefertigt.

Um zu testen, ob es bei der MSO der Ratte trotz der hohen Anzahl an Glyzinrezeptoren auf den Dendriten im adulten Tier dennoch eine entwicklungsabhängige Änderung in der Verteilung von Glyzinrezeptoren gibt, wurden

junge (vor Hörbeginn) und adulte Ratten miteinander verglichen. Wegen der größeren Verlässlichkeit und besseren Quantifizierbarkeit wurde dazu eine konventionelle DAB-Antikörperfärbung auf Gephyrin (jung und alt) und Glyzin (alt) angewandt.

Abbildung 41 zeigt ein Beispiel einer MSO-Zelle einer 10 Tage alten Ratte. Die Gephyrin-positiven Punkte umreißen das Zellsoma und einen Dendriten. Klar erkennbar ist die gleichmäßige Verteilung der Punkte über Soma, proximale sowie distale Dendriten.

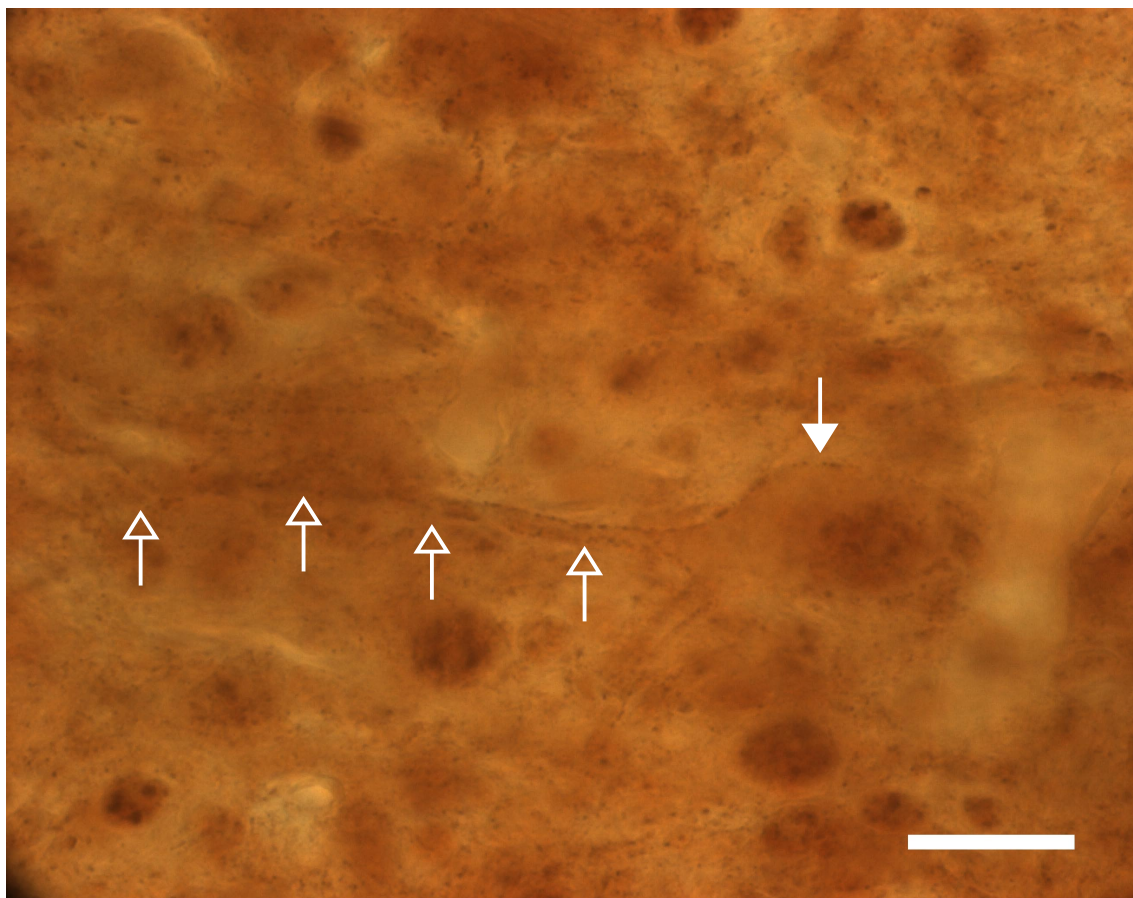


Abbildung 41 Gephyrin-DAB Färbung eines MSO-Neurons einer 10 Tage alten Ratte

Anhand der gephyrinpositiven Punkte lässt sich der Umriss dieser Zelle genau nachvollziehen. Vom Soma (voller Pfeil) zieht sich nach links ein Dendrit (offene Pfeile), der auf dessen gesamter Länge gleichmäßig Gephyrinfärbung zu sehen ist. Maßstab 20 μ m.

Gephyrinpositive Punkte an MSO-Zellen einer adulten Ratte verhalten sich ähnlich wie die schon durch fluoreszente Doppelfärbungen gezeigten Ergebnisse in 4.2.1. In Abbildung 42 ist die MSO-Zelle einer adulten Ratte gezeigt, die durch Antikörper gegen Gephyrin mit DAB gefärbt ist.

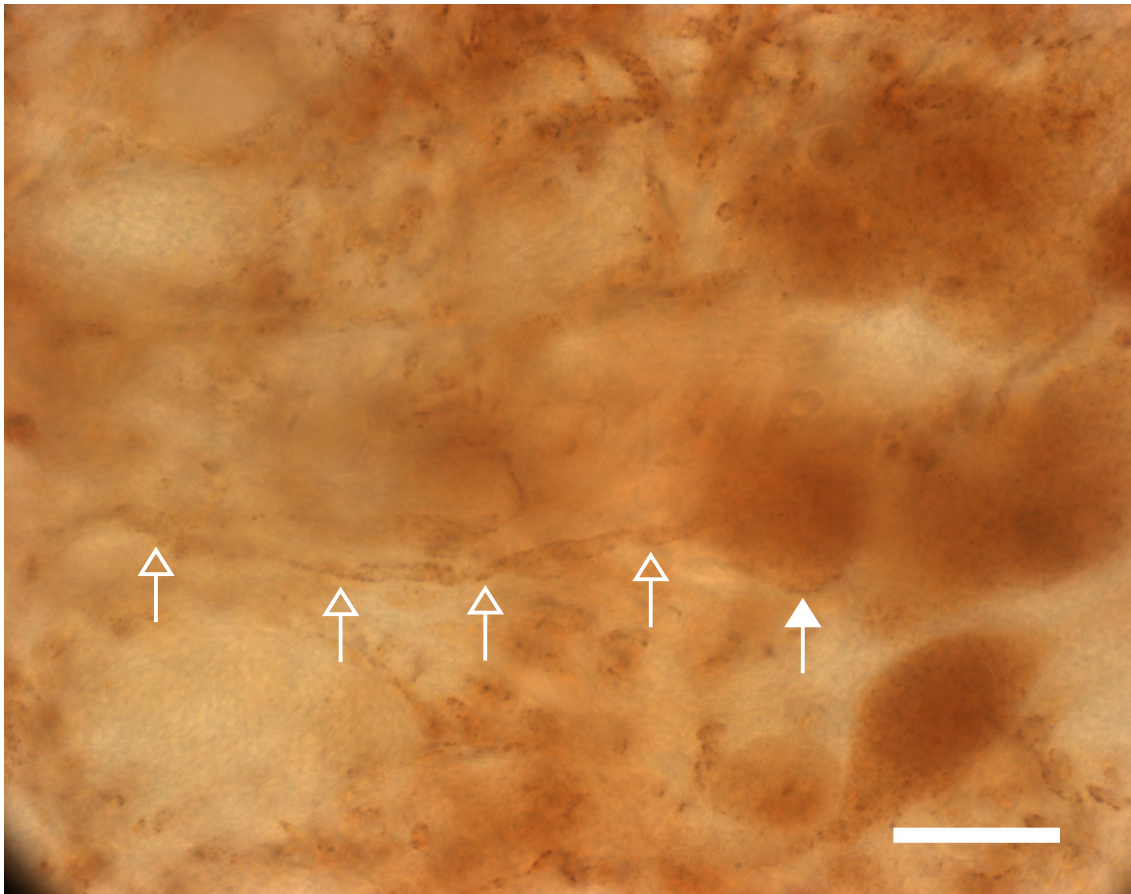


Abbildung 42 Gephyrin DAB-Färbung der MSO-Zelle einer adulten Ratte

Bei dieser MSO-Zelle einer adulten Ratte ist sind die Umrisse von Soma und Dendrit durch die gephyrinpositive Färbung zu erkennen. Der untere Rand des Somas (voller Pfeil) und der Dendrit (offene Pfeile) sind durch Punkte umrissen. Bei der adulten Ratte findet sich wie bei der juvenilen Ratte starke Färbung für inhibitorische Marker entlang des gesamten Dendriten. Die glyzinergeren Synapsen sind also nicht auf das Soma beschränkt. Maßstab 20 μm .

Auch hier beschreiben die Gephyrinpunkte die Umrisse der Zelle. Die gephyrinpositiven Puncta sind auf dem Soma, sowie gleichmäßig über den gesamten Dendriten verteilt zu finden. Im Vergleich zu der Zelle des 10 Tage alten Tieres von Abbildung 41 ist qualitativ kein Unterschied auszumachen. Um junge und adulte Tiere besser vergleichen zu können, wurden die Verteilungen der Gephyrinpuncta quantifiziert (Abbildung 43).

Die durchschnittliche absolute Dichte an Glyzinpuncta auf dem Soma einer MSO-Zelle bei einer adulten Ratte war 0.32 Puncta pro μm ($\pm 0,013$ s.e.m., Abbildung 43). Dieser Wert unterschied sich statistisch nicht signifikant von Ergebnissen bei adulten Wüstenrennmäusen (Kapfer et al., 2002). Der durchschnittliche Umfang der Zellkörper

in der Ratten-MSO war ebenfalls vergleichbar mit dem von Wüstenrennmäusen (Kapfer et al., 2002).

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Verteilung der Marker von inhibitorischen Synapsen sind in Abbildung 43 dargestellt. Auf der X-Achse ist der Abstand der 10 μm großen Teilabschnitte aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die auf das Soma normalisierte Dichte der Gephyrin- bzw. Glyzin-positiven Puncta (in Puncta/ μm) aufgetragen. In allen drei Gruppen ist die gemessene Dichte an den Dendriten im Vergleich zum Soma mindestens 1,3-Mal so hoch und zeigt keine starke Abnahme mit zunehmendem Abstand vom Zellsoma. Die Dichte von Glyzin und Gephyrin bei der adulten Ratte sind ähnlich. Die relative Dichte von Gephyrin und Glyzin auf den Dendriten war jedoch bei Ratten deutlich höher als bei Wüstenrennmäusen (Kapfer et al., 2002).

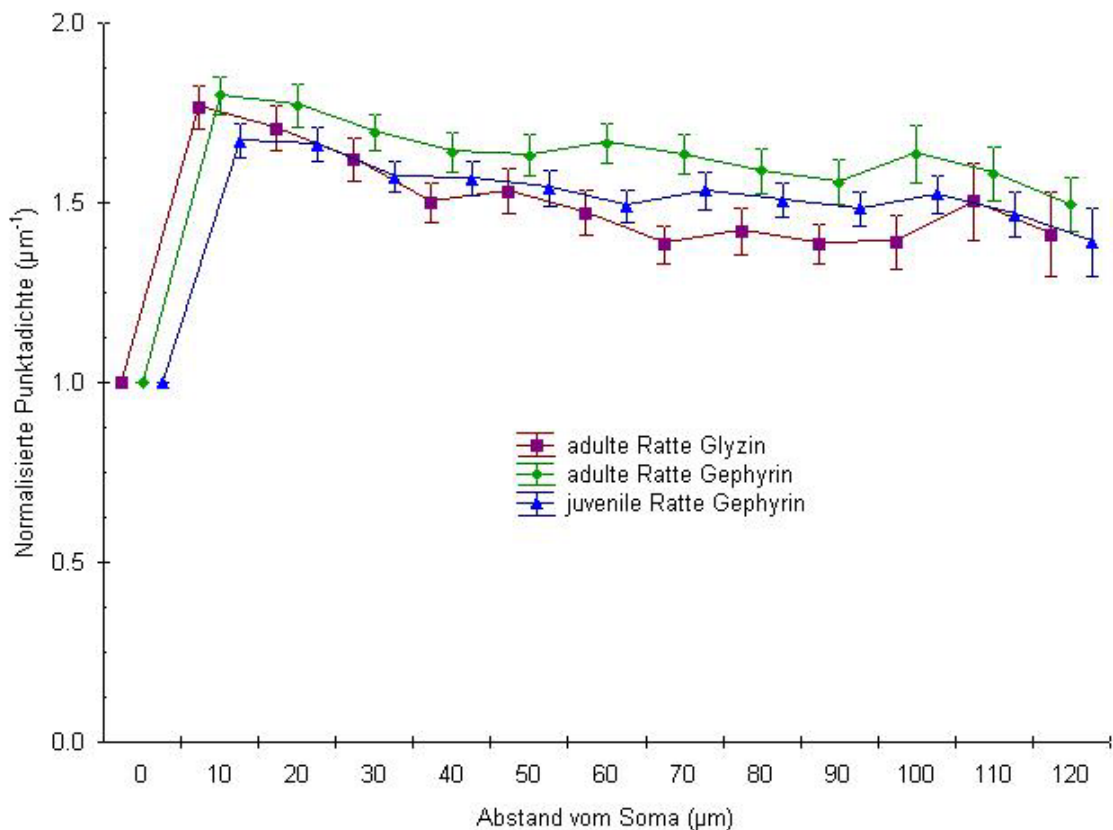


Abbildung 43 Quantitative Verteilung von Markern hemmender Synapsen an Ratten MSO-Neuronen

Für adulte Ratten ist die Verteilung von Glyzin und Gephyrin, für 10 Tage alte Ratten die Verteilung von Gephyrin auf den Dendriten im Verhältnis zum Abstand von Soma untersucht worden. Die Punktdichte auf den Dendriten ist zur Punktdichte auf dem Soma normalisiert worden. In der adulten Ratte gibt es keine Beschränkung der inhibitorischen Marker auf das Soma. Der fehlende Unterschied zu der Verteilung bei der juvenilen Ratte offenbart das Ausbleiben einer Entwicklung in der Verteilung von Glyzinrezeptoren nach Hörbeginn.

Bei adulten Ratten gibt es also im Gegensatz zur Wüstenrennmaus keine Restriktion der glyzinerger Synapsen auf das Soma der MSO-Neuronen. Die Verteilung von Gephyrin bei jungen Ratten unterscheidet sich außerdem nicht von der bei adulten Ratten.

Aus diesen Beobachtungen können wir schließen, dass es bei der Ratte im Laufe der Entwicklung keine räumliche Beschränkung von glyzinerger Eingängen an MSO-Zellkörpern gibt.

4.2.3 SCHWIERIGKEITEN BEI DER DARSTELLUNG EINZELNER NEURONE IN DER MSO DER RATTE

Wie schon in Abschnitt 4.2.1 erwähnt, war die Darstellung einzelner Zellen der MSO der Ratte deutlich schwieriger als bei der Wüstenrennmaus. Einerseits war die MAP2-Färbung weniger spezifisch, andererseits waren Zellkörper mit intakten Dendriten schwer auszumachen. Um der Frage nach der Spezifität der MAP2-Färbung nachzugehen wurden einige Gehirnschnitte nur mit MAP2, also mit einem Einfachfärbungsprotokoll gefärbt. Ein Beispiel davon ist bereits in Abbildung 37 dargestellt.

Die reine MAP2-Färbung brachte qualitativ zufriedenstellende Ergebnisse, war spezifisch, und es konnten einzelne Zellen identifiziert werden. Jedoch konnten nur wenige Zellen mit langen Dendriten gefunden werden. Möglicherweise lag der Grund dafür darin, dass sich Dendriten von MSO-Zellen der Ratte nicht streng entlang der mediolateralen Richtung erstrecken. Um diese Hypothese nachzuprüfen, wurden horizontale Schnitte des Gehirnstamms angefertigt und ebenfalls mit MAP2 gefärbt. Die Lage der MSO in der horizontalen Ebene wurde mit Hilfe eines Ratten-Hirnatlas (Paxinos and Watson, 1986) bestimmt. In Abbildung 44 ist deutlich eine Zelle zu erkennen, deren Dendrit sich mehr nach rostral als nach lateral streckt. Zellen der Ratten MSO sind also nicht nur innerhalb der coronalen Ebene ungeordneter als bei der Wüstenrennmaus, zusätzlich beschränkt sich die Ausbreitungsrichtung der Dendriten nicht nur auf die coronale Ebene. Dadurch verringert sich im coronalen Gehirnschnitt die Wahrscheinlichkeit erheblich, eine intakte Zelle mit Dendriten in einer Ebene zu finden.

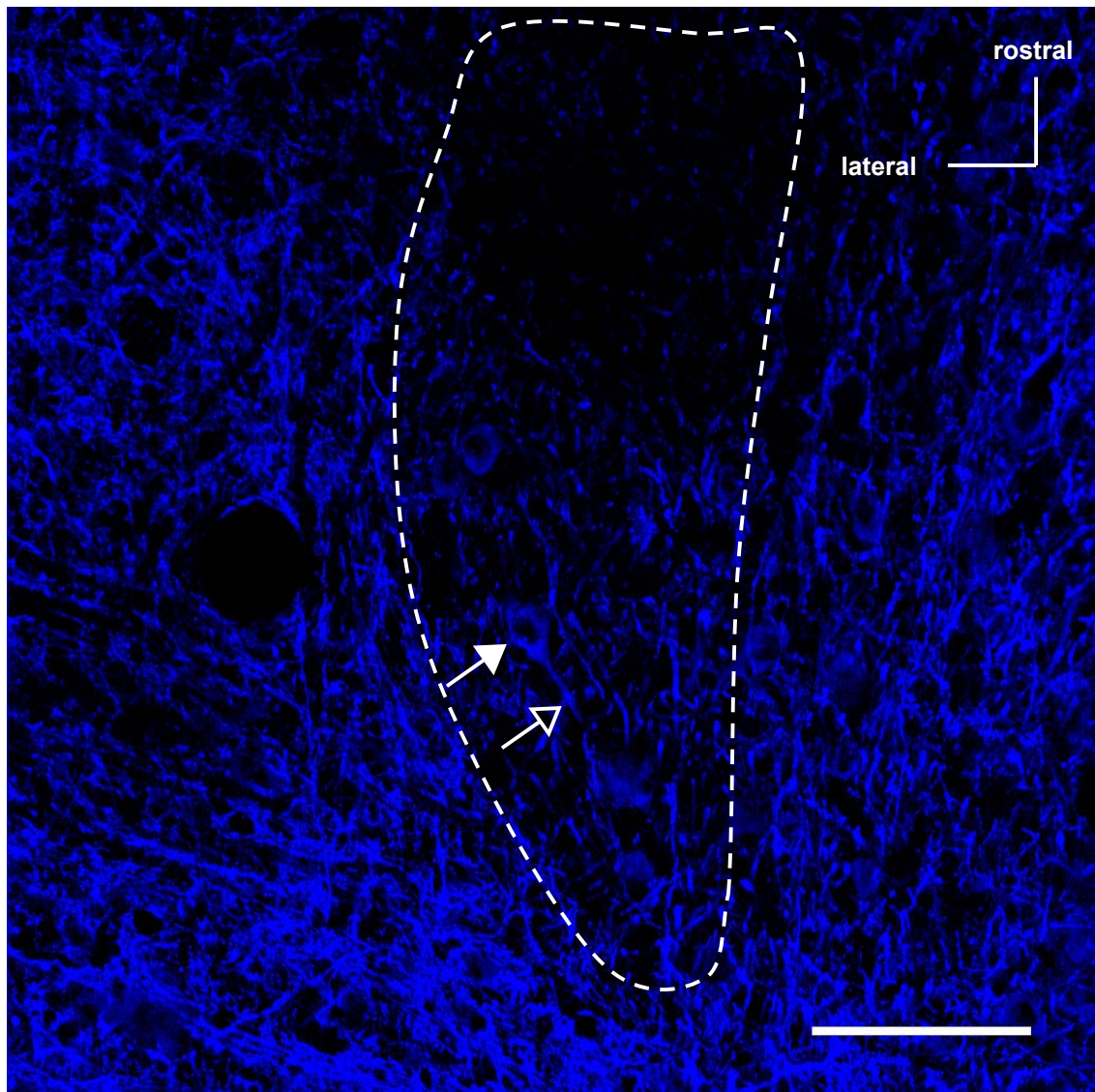


Abbildung 44 Horizontalschnitt durch die MSO einer Ratte

Dieser mit MAP2 gefärbte Horizontalschnitt durch eine Ratten MSO zeigt die Lage einzelner Zellen. Die Bildoberseite entspricht der caudalen Richtung, die rechte Seite entspricht der lateralen Richtung. Deutlich zu erkennen ist das Soma einer MSO-Zelle (voller Pfeil) und einer ihrer Dendriten (offener Pfeil). Die Richtung dieses Dendriten zeigt eindeutig mehr nach rostral als nach lateral. Maßstab 100 μm .

Auf den folgenden drei Abbildungen (Seiten 71-73) werden MAP2/Gephyrin-Färbungen von drei verschiedenen Kerngebieten im oberen Olivenkomplex miteinander verglichen. Eine Doppelfärbung der MSO in der Ratte zeigt Abbildung 45. Abbildung 46 und Abbildung 47 zeigen Doppelfärbungen von LSO bzw. MNTB. Im Vergleich der drei Bilder des gleichen Hirnschnittes wird deutlich, dass die Gewebe der drei Kerne sehr unterschiedlich gefärbt sind.

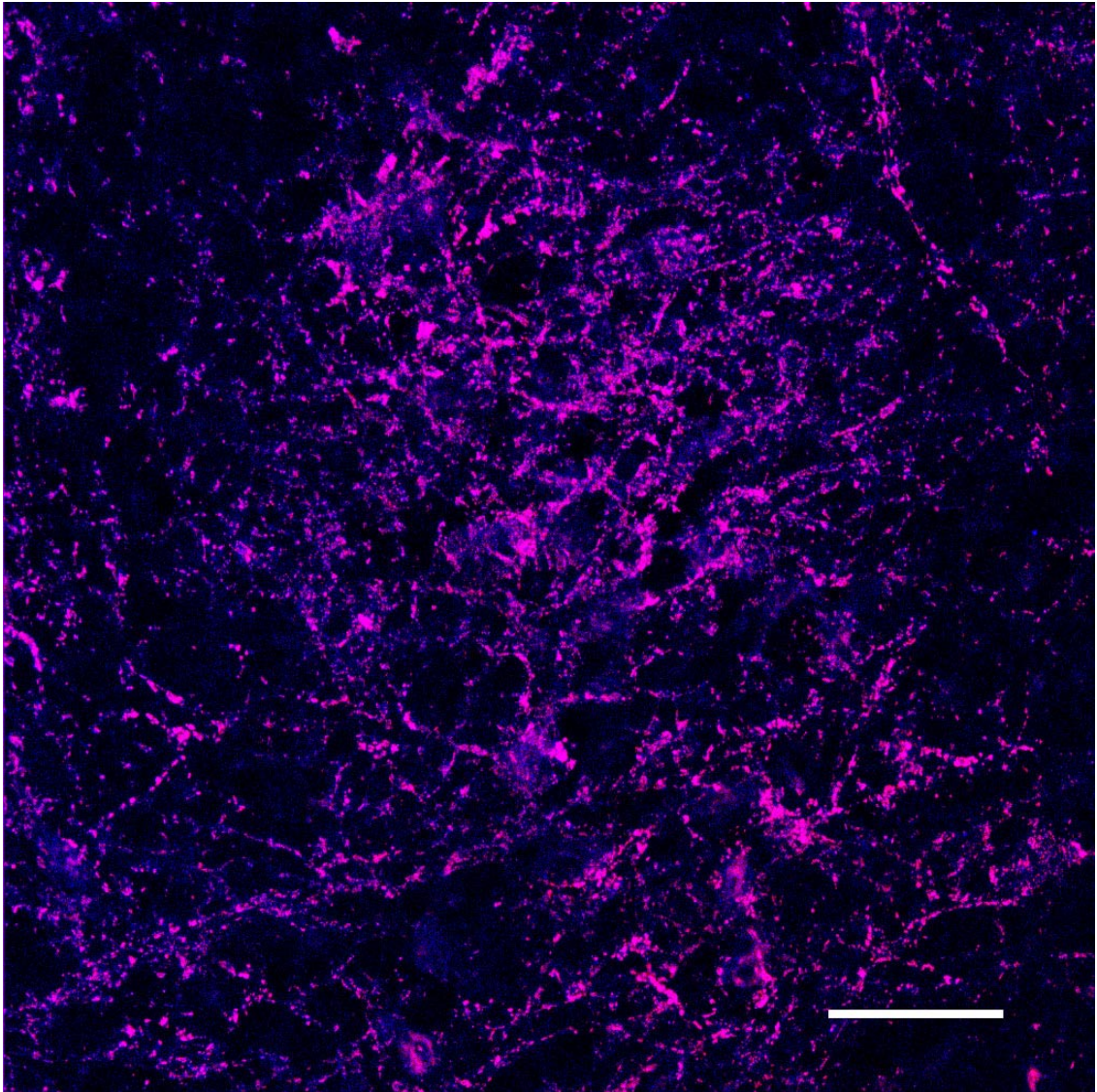


Abbildung 45 MAP2/Gephyrinfärbung einer Ratten MSO

Die MSO einer Ratte ist gegen MAP2 (blau) und Gephyrin (rosa) gefärbt. Einzelne Zellen sind kaum auszumachen. Maßstab 40 μm .

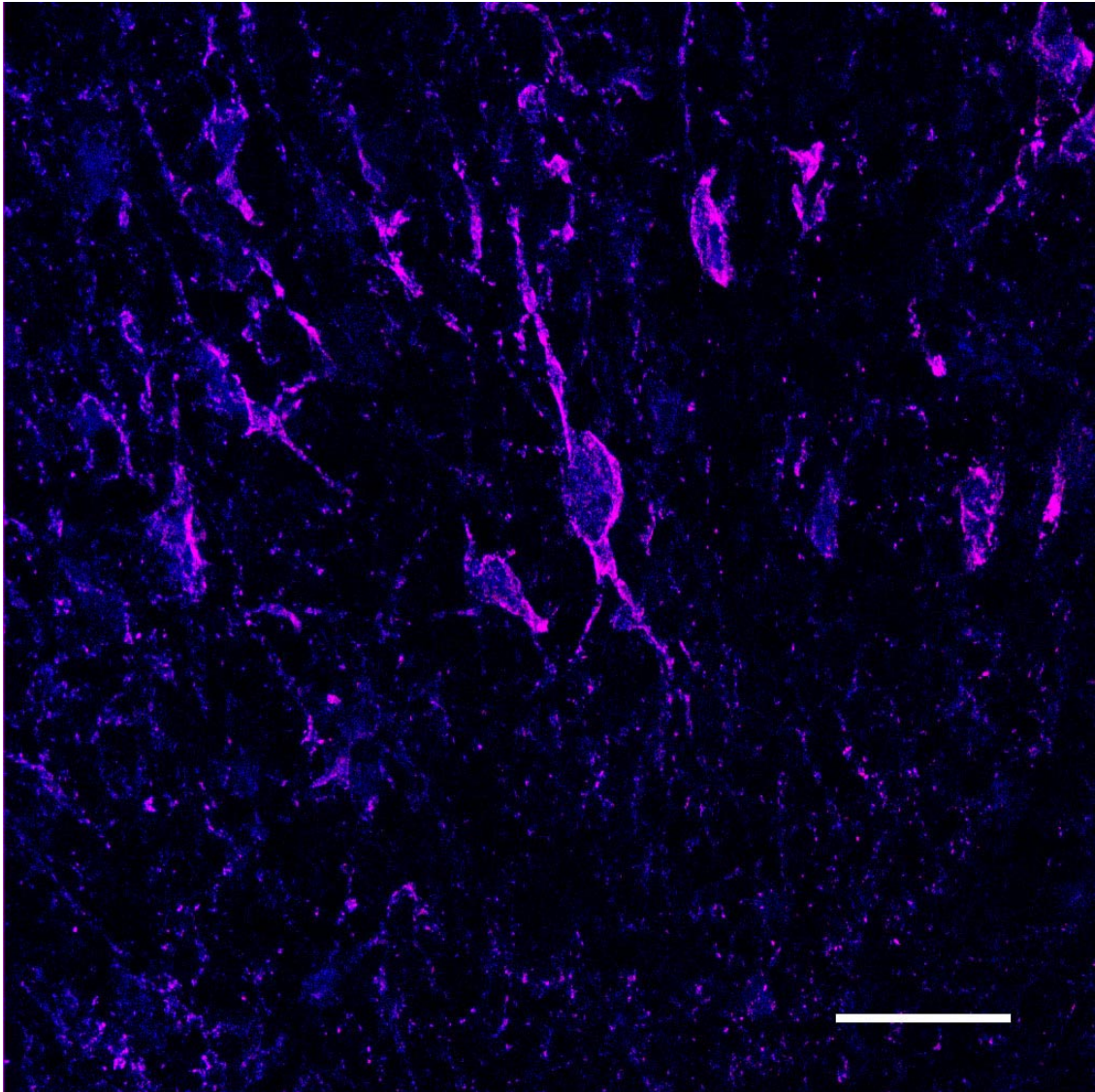


Abbildung 46 MAP2/Gephyrin-Färbung einer LSO-Zelle der Ratte

Die LSO-Zelle des gleichen Gehirnschnittes wie in Abbildung 45 ist hier mit MAP2 (blau) und Gephyrin (rosa) gefärbt. Anders als in der MSO ist hier deutlich eine Zelle mit ihren Dendriten zu erkennen. Die MAP2 und auch die Gephyrin-Antikörperfärbung sind sehr spezifisch. Maßstab 40 μm .

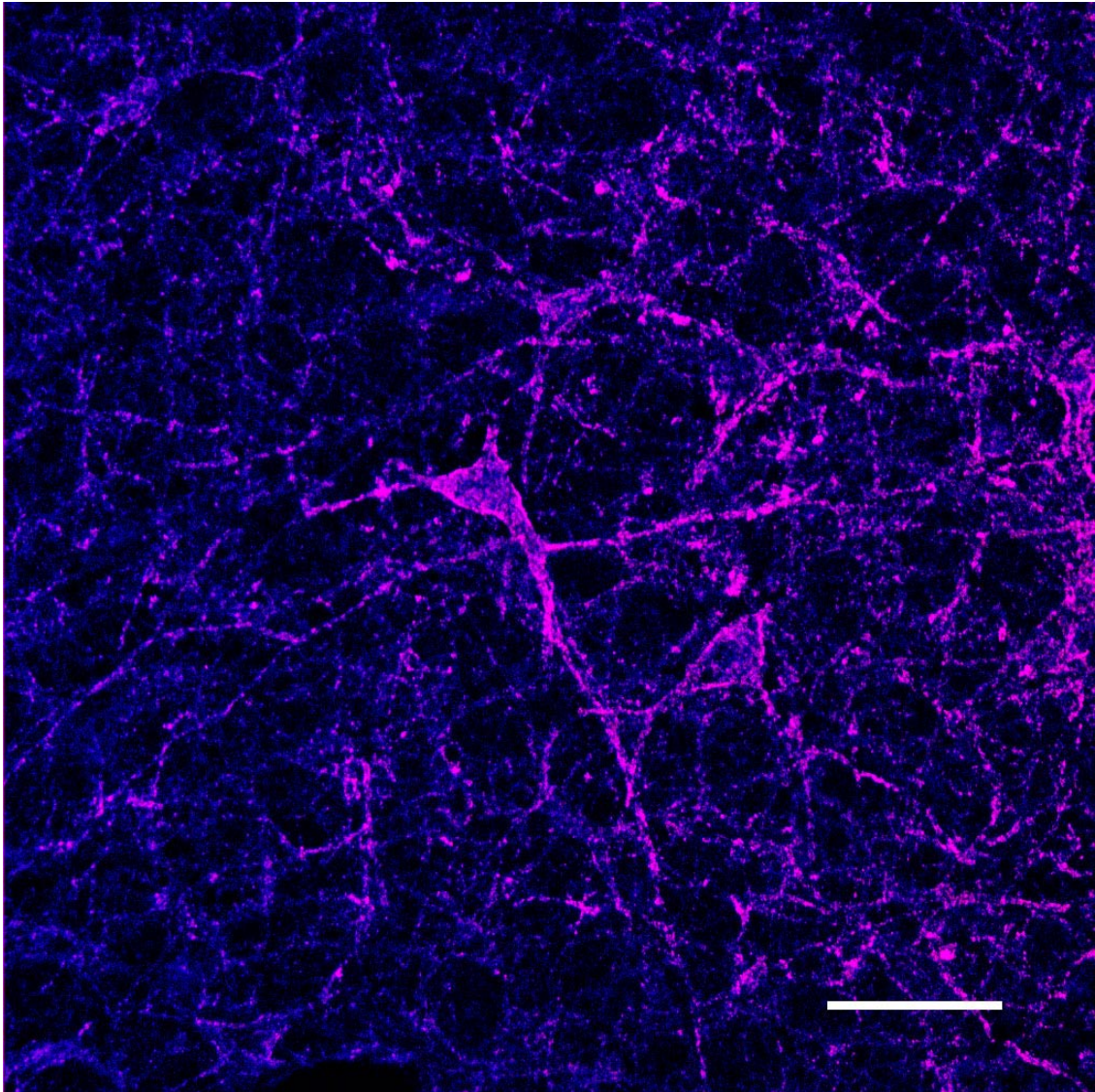


Abbildung 47 MAP2/Gephyrin-Färbung einer MNTB-Zelle der Ratte

MAP2- und Gephyrinantikörperfärbung des gleichen Gehirnschnittes wie in Abbildung 45 und Abbildung 46. Zu sehen ist eine MNTB-Zelle mit ihren Dendriten. Wie schon bei der gezeigten LSO-Zelle ist auch hier die Färbung sehr spezifisch. (Map2: blau; Gephyrin: rosa). Maßstab 40 µm.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass Zellen der Ratten-MSO schlechter mit der Doppelfärbemethode gefärbt werden können als Neurone von umgebenden Kernen und außerdem der strukturelle Unterschied zur Wüstenrennmaus-MSO das Auffinden einzelner Zellen mit intakten Dendriten erschwert.

4.3 EINFLUSS DER HÖRERFAHRUNG AUF DIE VERARBEITUNG VON INTERAURAL EN ZEITDIFFERENZEN

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Entwicklung der glyzinergen Eingänge zu MSO-Neuronen bei der Wüstenrennmaus abhängig ist von akustischer Erfahrung (Kapitel 4.1). Weiter ist bekannt, dass die Inhibition eine maßgebliche Rolle in der Abstimmung der ITDs auf den physiologischen Bereich hat (siehe auch 2.3). Die Arbeitshypothese für das folgende Projekt war daher die Annahme, dass eine veränderte Verteilung der glyzinergen Synapsen an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus auch einen Einfluß auf die ITD-Kodierung hat. Es wurden daher die ITD-Verarbeitung von Tieren mit normaler Hörerfahrung mit der von Tieren, die in der Noisebox aufgezogen wurden, verglichen. Um mögliche Nebeneffekte des weißen Rauschens auszuschließen, wurden außerdem adulte Tiere unter gleichen Bedingungen für den gleichen Zeitraum (siehe 3.2) in der Noisebox gehalten und nach einer Erholzeit die ITD-Empfindlichkeit getestet. Weiter wurde die Abstimmung der ITDs in Wüstenrennmäusen kurz nach Hörbeginn gemessen. Kurz nach Hörbeginn (P14-P15) sind die inhibitorischen Synapsen an MSO-Zellen noch nicht auf das Soma beschränkt (Ehrhardt, 2000). Sollte die Verteilung der hemmenden Eingänge also eine Auswirkung auf das ITD-Tuning haben, so sollte hier auch ein Unterschied zu ausgewachsenen Tieren vorhanden sein. Ein entscheidender Teil der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von Einzelzelleableitungen im DNLL der Wüstenrennmaus. Da der DNLL einen direkten erregenden Eingang von der MSO erhält, sollte herausgefunden werden, ob Ableitungen vom DNLL eine Alternative zu Ableitungen aus dem DNLL darstellen.

4.3.1 LAGE DES DNLL DER WÜSTENRENNMAUS

Die Position des DNLL wurde durch stereotaxische Versuche ermittelt. Abbildung 48 zeigt einen coronalen Gehirnschnitt durch den auditorischen Hirnstamm einer Wüstenrennmaus. In diesem Schnitt ist neben dem oberen Olivenkomplex das auditorische Mittelhirn, der IC, und der DNLL enthalten. Der DNLL schließt ventral an den IC an, erstreckt sich aber viel weniger in mediolateraler Richtung als der IC.

Um die Ableitposition zu ermitteln, wurden farbige beads (Luma Fluor Inc., Naples, FL, USA) an bestimmten Positionen injiziert, die später stereotaxisch zugeordnet wurden und so Aufschluss über die Eindringposition der Elektrode zuließen.

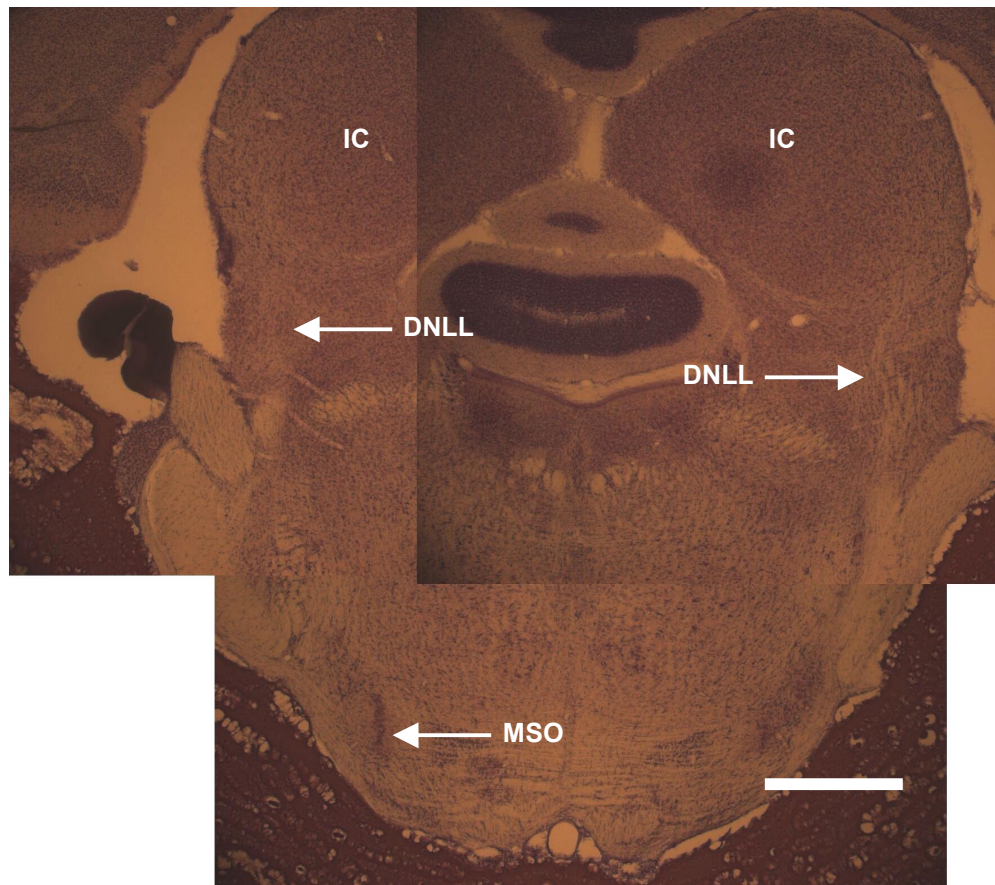


Abbildung 48 Coronaler Gehirnschnitt eine Wüstenrennmaus

Der abgebildete coronale Gehirnschnitt einer Wüstenrennmaus zeigt die Lage des DNLL relativ zum IC und dem SOC. Der DNLL schließt ventral an das auditorische Mittelhirn an. Maßstab 1 mm.

Die tatsächlichen Ableitpositionen wurden am Ende des Versuchs mit spannungsinduzierten Läsionen markiert. In Abbildung 49 ist ein Beispiel einer solchen Markierung zu sehen. Mit den in das Gewebe gebrannten Elektrodenspuren und die durch den Mikromanipulator angezeigte Eindringtiefe der Elektrode in das Gewebe konnte die Ableitposition bestätigt werden.

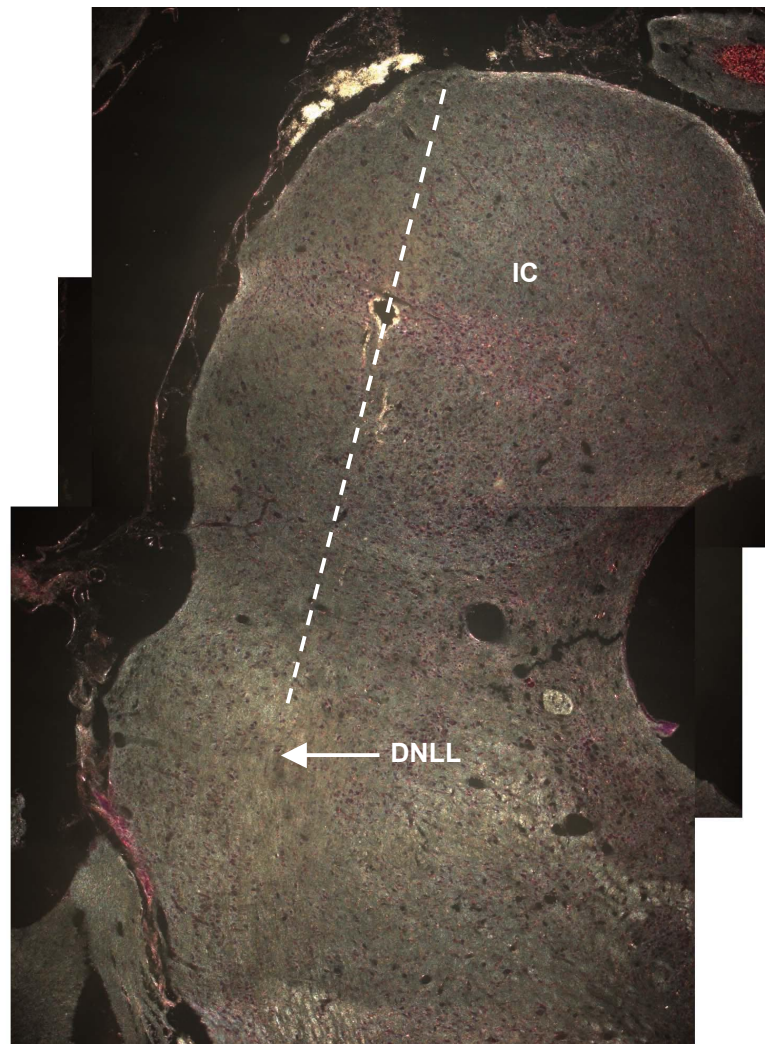


Abbildung 49 Nissl-Färbung eines coronalen Gehirnschnittes mit Spannungsinduzierter Läsion
 Im IC sind deutlich die durch spannungsinduzierte Läsion entstandenen Elektroden Spuren erkennbar, die in Richtung der gestrichelten Linie verlaufen. Der Verlauf der Elektroden Spur und die Eindringtiefe lassen auf eine Ableitung im DNLL schließen.

Mit der durch die spannungsinduzierte Läsion erkennbare Ausrichtung der Elektroden Spuren (entlang der gestrichelten Linie) und der Eindringtiefe konnte die Ableitposition im DNLL bestätigt werden. Die gestrichelte Linie gibt die dorsoventrale Achse an, d.h. der Gehirnschnitt ist etwas gekippt dargestellt.

4.3.2 ITD-SENSITIVITÄT IM DORSALEN NUKLEUS DES LATERALEN LEMNISKUS

Es wurden 42 ITD-sensitive Einzelzellen von Kontrolltieren abgeleitet. ITD-sensitive Zellen werden unterteilt in ‚peak type‘, ‚trough-type‘ und ‚intermediate-type‘ (siehe

2.2.2; Yin and Kuwada, 1983; Spitzer and Semple, 1995; Batra et al., 1997a; Batra et al., 1997b; Fitzpatrick et al., 2000; Fitzpatrick and Kuwada, 2001; Ramachandran and May, 2002). ‚Peak-type‘ ITD-Funktionen erhalten binaurale erregenden Eingänge (E/E) und haben ihren Ursprung in der MSO, ‚trough-type‘ ITD-Funktionen erhalten von einem Ohr einen erregenden und vom anderen einen hemmenden Eingang (E/I) und haben ihren Ursprung in der LSO. ITD-sensitive Zellen, die sich nicht in eine dieser drei Kategorien einteilen lassen werden als ‚irregular-type‘ bezeichnet. Um diese Unterteilung vornehmen zu können, müssen die bei verschiedenen Frequenzen aufgenommenen ITD-Funktionen einer Zelle in einem IPD/Frequenz-Diagramm aufgetragen werden (Abbildung 51, siehe auch 2.2.2) und eine lineare Annäherung ermittelt werden. Der Schnittpunkt der linearen Annäherungsgleichung mit der Y-Achse (Einheit: Zyklen) wird charakteristische Phase (CP) genannt. Je nach Wert des Schnittpunkts besitzt die Zelle Eigenschaften eines ‚peakter‘ (–0,125 bis +0,125), ‚intermediate‘ (+0,125 bis +0,375) oder ‚trougher‘ (+0,375 bis +0,615) (siehe auch 2.2.2).

Die in Abbildung 50 gezeigte DNLL-Zelle wurde bei verschiedenen Frequenzen auf ITDs getestet. Die Maxima der Funktionen liegen bei jeder Frequenz ungefähr bei der gleichen ITD. Die CP erhält man, indem man die mittlere beste IPD der jeweiligen ITD-Funktion gegen die Stimulusfrequenz aufträgt. Die CP ist der Schnittpunkt der Angleichungsgeraden mit der Y-Achse (Abbildung 51). Die CP dieser Zelle liegt bei 0,0975 Zyklen. Die Lage der CP zwischen –0,125 und +0,125, zeichnet diese Zelle als ‚peak-type‘ Neuron aus. Aus dem Phasen-Frequenz Diagramm in Abbildung 51 lässt sich noch ein weiterer Wert ablesen, die charakteristische Verzögerung (engl. characteristic delay, CD). Mathematisch ist die CD die Steigung der linearen Angleichungsgerade und gibt die ITD an, bei der die normalisierten ITD-Funktionen der verschiedenen Stimulusfrequenzen aufeinander fallen. Bei einem ‚peak-type‘ Neuron stimmt der Wert der CD theoretisch mit der besten ITD der ITD-Funktionen überein.

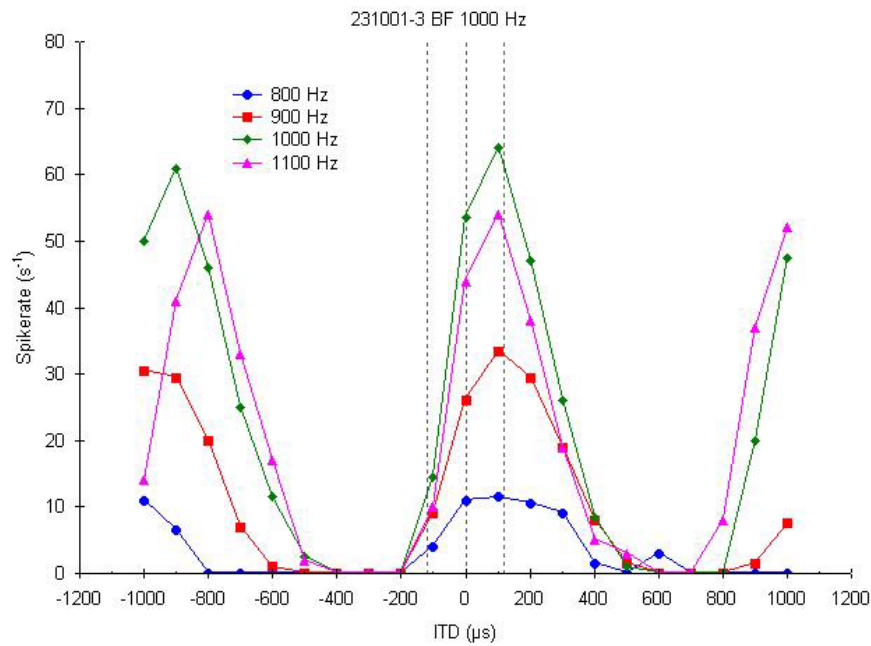


Abbildung 50 ITDs bei verschiedenen Frequenzen bei einer peak-type Zelle

ITD-Funktionen einer ‚peak-type‘-Zelle. Die bei verschiedenen Frequenzen aufgenommenen ITD-Funktionen haben ihre maximale Antwort bei derselben ITD. Die ITDs der minimalen Antworten, der ‚troughs‘, unterscheiden sich jedoch. Die beste ITD an der BF liegt bei 118 μ s.

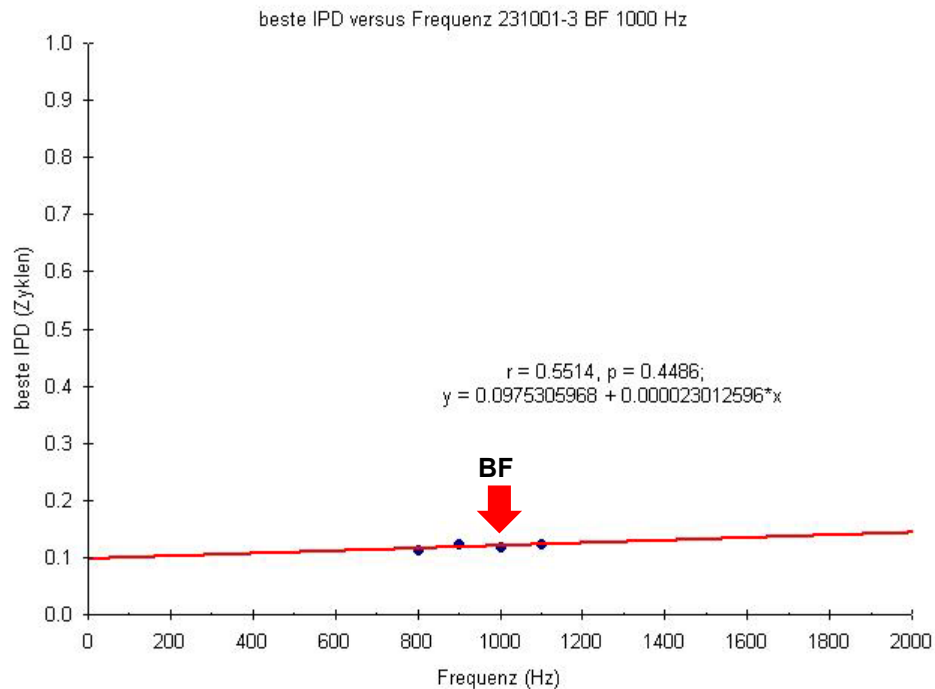


Abbildung 51 Beste IPDs im Verhältnis zu Frequenz

Der Schnittpunkt der Angleichungsgerade liegt bei 0,0975 und kennzeichnet die Zelle damit als ‚peaker‘. Allerdings liegt der Korrelationskoeffizient r unter 0,65 und die Korrelation ist auch nicht signifikant (siehe P -Wert).

Die Korrelation der besten IPDs im Verhältnis zur Stimulusfrequenz ist nicht signifikant ($P = 0,4485$). Die beste IPD ist bei verschiedenen Stimulusfrequenzen kaum unterschiedlich. Bei diesem Neuron stimmt die beste ITD nicht mit der CD überein.

Neben ‚peak-type‘ Neuronen wurden in der Population der ITD-sensitiven Zellen auch ‚intermediate‘ Neurone gefunden. Diese Neurone waren zwar von beiden Seiten erregbar, konnten aber aufgrund ihrer CP nicht zu den ‚peak-type‘ Neuronen gezählt werden. Ein Beispiel für eine solche Zelle ist in Abbildung 52 gezeigt. Die Bestfrequenz dieser Zelle ist etwa bei 1000 Hz, alle anderen Frequenzen erzeugen schwächere Antworten. Ein Phasen-Frequenz-Plot zeigt deutliche Abweichungen in der besten IPD bei verschiedenen Frequenzen auf. Jedoch ist die ITD-Sensitivität bei allen Frequenzen außer der Bestfrequenz wenig ausgeprägt. Die CP dieser Zelle liegt bei 0,326 und fällt somit in die Kategorie ‚intermediate‘.

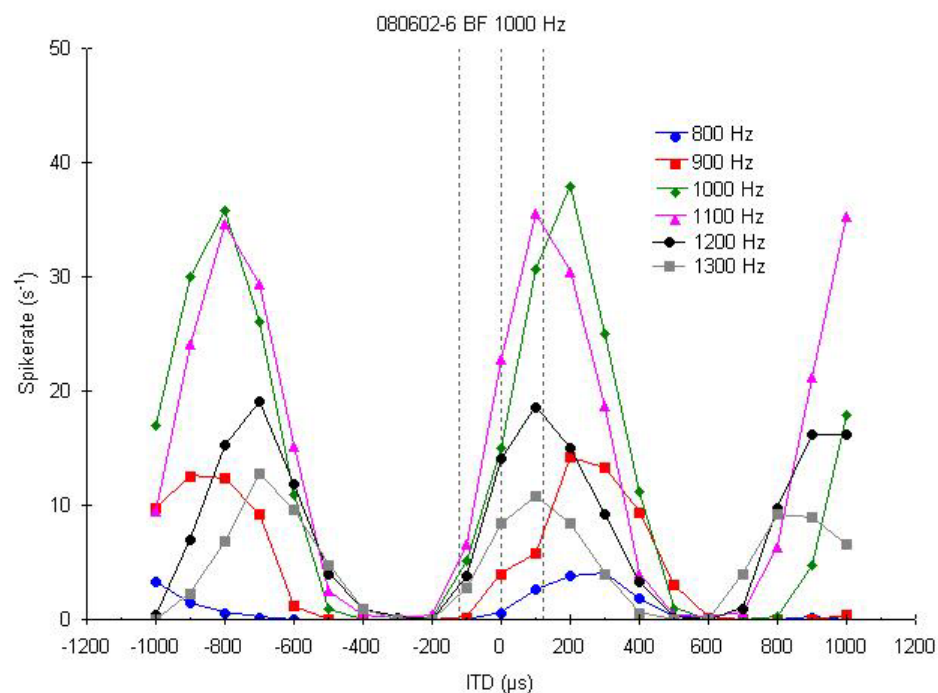


Abbildung 52 ITD-Funktionen einer ‚intermediate‘ Zelle

Die Bestfrequenz der Zelle liegt bei 1000 Hz. Die Antwortraten bei anderen Frequenzen sind schwächer. Die gestrichelten grauen Linien definieren den physiologisch relevanten Bereich.

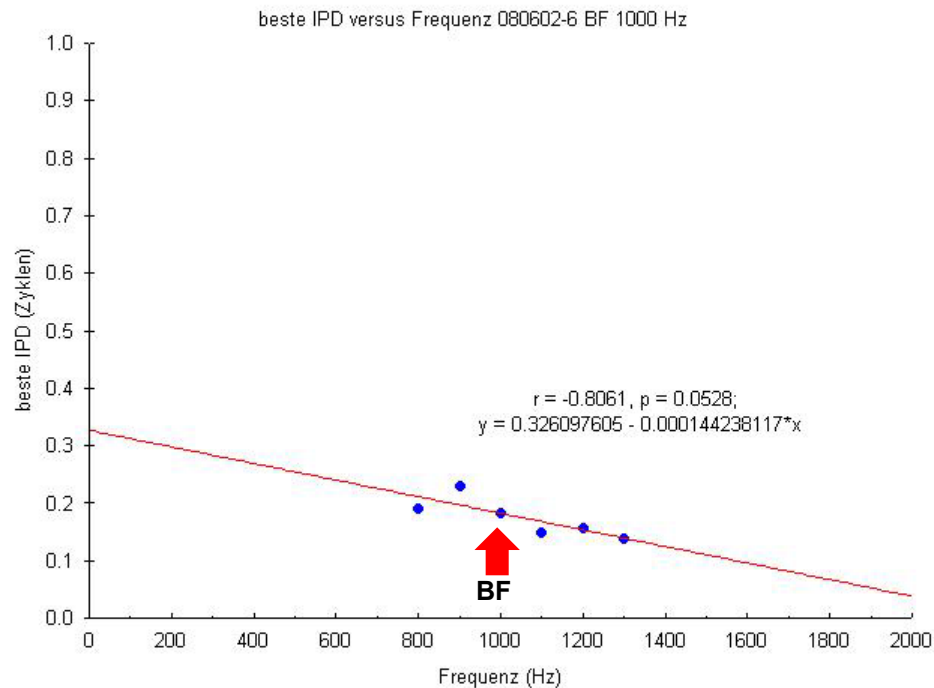


Abbildung 53 Phasen-Frequenz-Plot einer ‚intermediate‘ Zelle
 Die besten IPDs dieser Zelle sind gut korreliert, aber nicht signifikant.

In Abbildung 54 sind die ITD-Funktionen bei verschiedenen Frequenzen einer weiteren ‚intermediate-type‘ Zelle zu sehen. Die Bestfrequenz dieser Zelle liegt bei 1100 Hz. Interessanterweise geht die Antwortrate der Zelle bei allen Frequenzen außer 1000 Hz nie gegen 0. Die besten IPDs liegen für alle Frequenzen um 0,125 Zyklen (Abbildung 55). Die CP dieser Zelle ist 0,137 Zyklen und damit zählt dieses Neurons zu den ‚intermediate-types‘. Allerdings könnte ein oder mehrere zusätzliche Werte zu einer anderen CP führen.

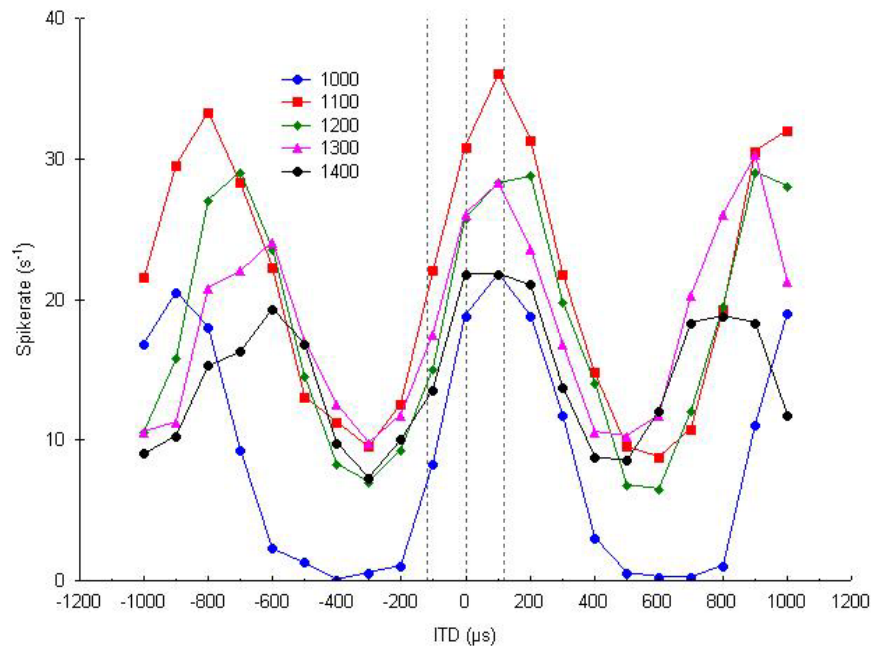


Abbildung 54 ITD-Sensitivität einer ‚intermediate‘ Zelle bei verschiedenen Frequenzen

Die Bestfrequenz dieser Zelle ist 1100 Hz, aber auch bei anderen Frequenzen ist die ITD-Sensitivität hoch. Die Maxima der ITD-Funktionen liegen alle an der Grenze des physiologischen Bereiches (grau gestrichelte Linien).

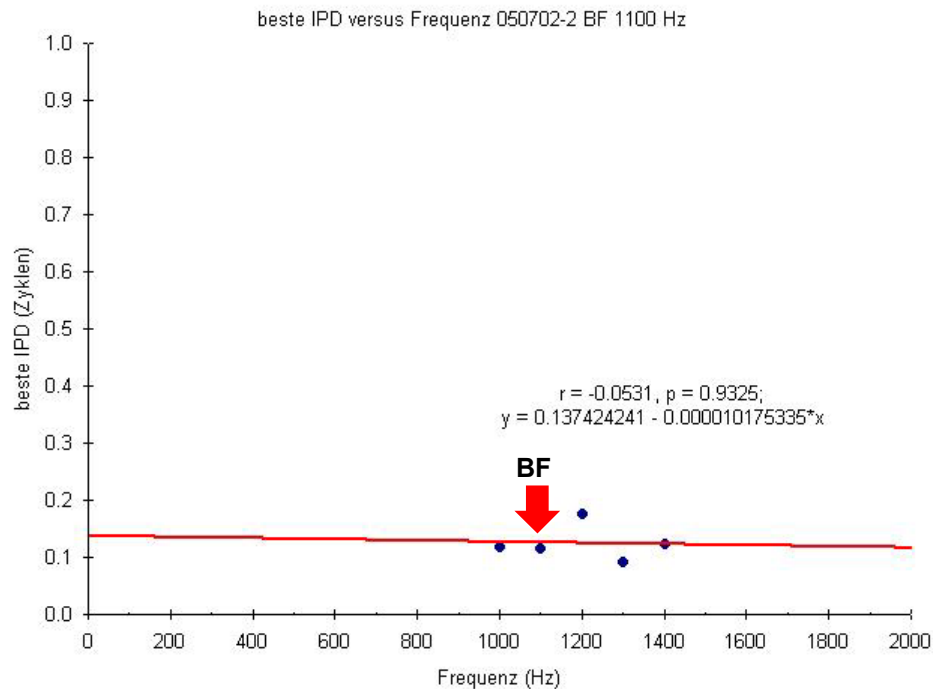


Abbildung 55 Beste IPDs versus Frequenz einer ‚intermediate‘ Zelle

Die CP dieser Zelle ist 0,137, obwohl die besten IPDs für alle gemessenen Frequenzen um 0,125 Zyklen liegen.

Ein dritter Typus der ITD-sensitiven Zellen sind die ‚trougher‘-Neurone. ‚Trough-type‘ Neurone haben die Minima von ITD-Funktionen bei verschiedenen Frequenzen bei einer gemeinsamen ITD. Ihre CP liegt zwischen +0,375 und +0,615 und die CD gibt die Lage des ‚troughs‘ an. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine reinen ‚trougher‘ gefunden.

Neben diesen drei Gruppen gibt es noch ‚irregular-type‘ Neurone, die sich anhand ihrer CP nicht kategorisieren lassen. Ein Beispiel für einen ‚irregular-type‘ ist in Abbildung 56 zu sehen. Die Maxima der ITD Funktionen der verschiedenen Frequenzen liegen nicht bei der gleichen ITD. Die Minima von vier Frequenzen (800, 900, 1000, 1100) liegen jedoch bei einer ITD, während die von 600 und 700 Hz leicht davon abweichen. Der komplexe, nicht lineare Phasenplot des Neurons ist in Abbildung 57 gezeigt. Aufgrund der spezifischen Anordnung der besten IPDs der verschiedenen Frequenzen entlang zweier Linien kann es möglich sein, dass diese DNLL-Zelle Eingänge von zwei MSO-Neuronen bekommt.

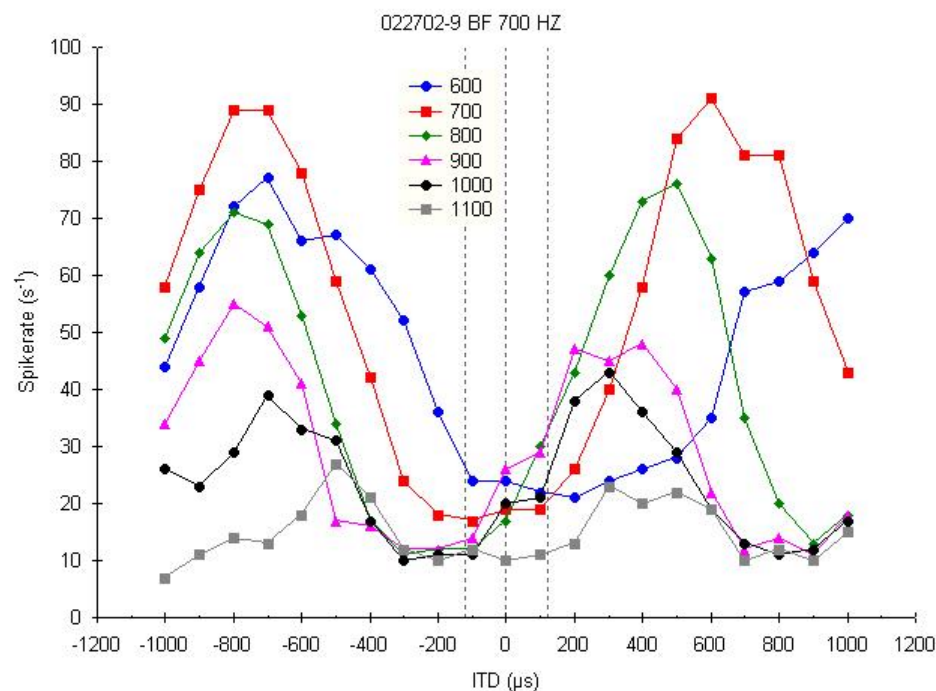


Abbildung 56 ITD-Funktionen bei verschiedenen Frequenzen eines ‚irregular‘ Neurons

Die Maxima der ITD-Funktionen der verschiedenen Frequenzen liegen alle bei verschiedenen ITDs. Die Minima decken sich für die Frequenzen 800 bis 1100 Hz. Die Modulationstiefe im physiologischen Bereich (grau gestrichelte Linien) ist sehr gering.

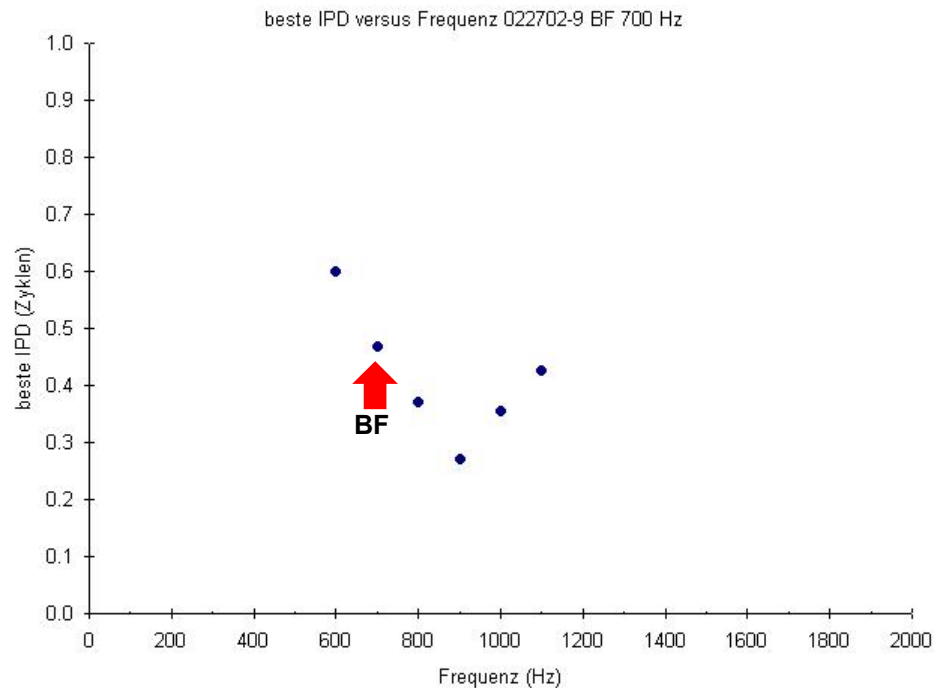


Abbildung 57 Beste IPDs versus Frequenzen eines ‚irregular‘ Neurons

Die besten IPDs dieses Neurons liegen zwischen 0,27 und 0,60 Zyklen und sind entlang zweier Linien angeordnet.

Insgesamt waren von den 41 bei verschiedenen Frequenzen getesteten ITD-sensitiven Neuronen 24 ‚peak-type‘, 14 ‚intermediate-type‘ und 3 ‚irregular-type‘. Eine ITD-sensitive Zelle wurde nur bei einer Frequenz getestet und kann daher nicht mit Sicherheit in eine der Kategorien eingeteilt werden. Ihre beste IPD war 0,133 und sie war von beiden Seiten erregbar, daher wurde sie zu den Neuronen der Kontrollgruppe gezählt. Außer den ‚irregular-type‘ Neuronen wurden alle ITD-sensitiven Zellen in die Kontrollgruppe aufgenommen (n=39).

Die charakteristische Verzögerung aller Zellen der Kontrollgruppe ist als Funktion der Bestfrequenz jeder Zelle in Abbildung 58 aufgetragen. Dieser Scatterplot und seine lineare Annäherung weisen darauf hin, dass es eine Beziehung zwischen Bestfrequenz und charakteristischer Verzögerung im DNLL geben könnte. CDs sind mit niedrigerer BF tendenziell größer, und CDs von Zellen mit einer BF <700 Hz sind nicht negativ.

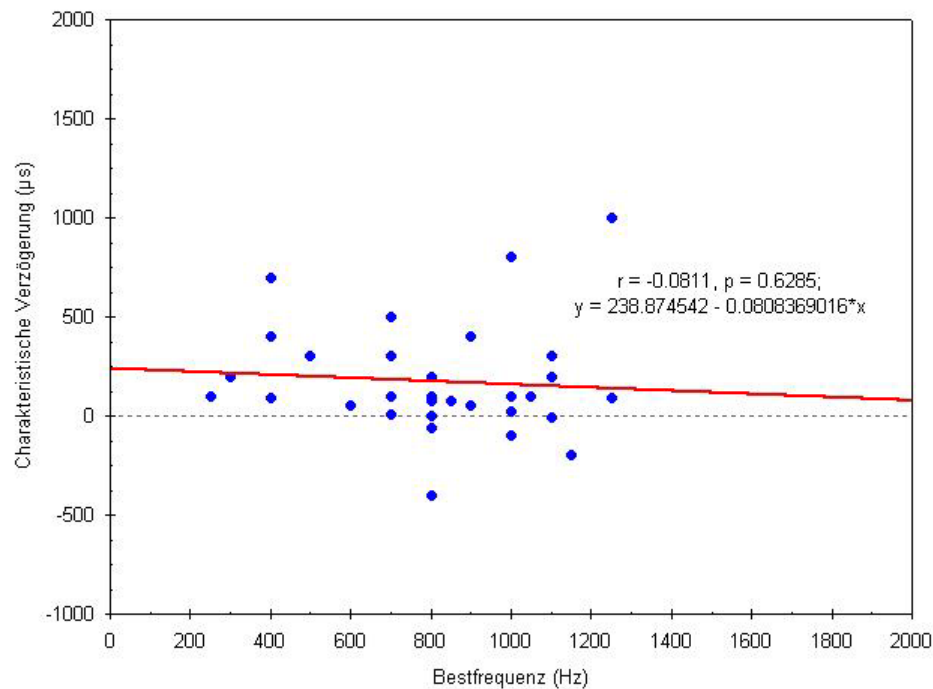


Abbildung 58 Charakteristische Verzögerung (CD) in Abhängigkeit zur Bestfrequenz

Mit niedrigerer Bestfrequenz lässt sich ein leichter Trend zu längerer charakteristischer Verzögerung feststellen. Die Verteilung ist allerdings schlecht korreliert und nicht signifikant.

In Abbildung 59 sind die besten ITDs an der BF aller ITD-sensitiven Zellen gegen ihre Bestfrequenz aufgetragen. Die drei Kategorien ‚peaker‘, ‚intermediate‘ und ‚irregular‘ sind auf die gesamte Population gleichmäßig verteilt, so dass keine bestimmte Ausrichtung einer Gruppe zu erkennen ist. Während die Verteilung der besten ITDs in Abbildung 59b deutlich zeigt, dass die besten ITDs mit abnehmender BF zunehmen, ist dieser Trend bei der Verteilung der CDs in Abbildung 58 nur leicht zu erkennen. Die Verteilungen von CDs und besten ITDs an der BF stimmen nicht vollständig überein.

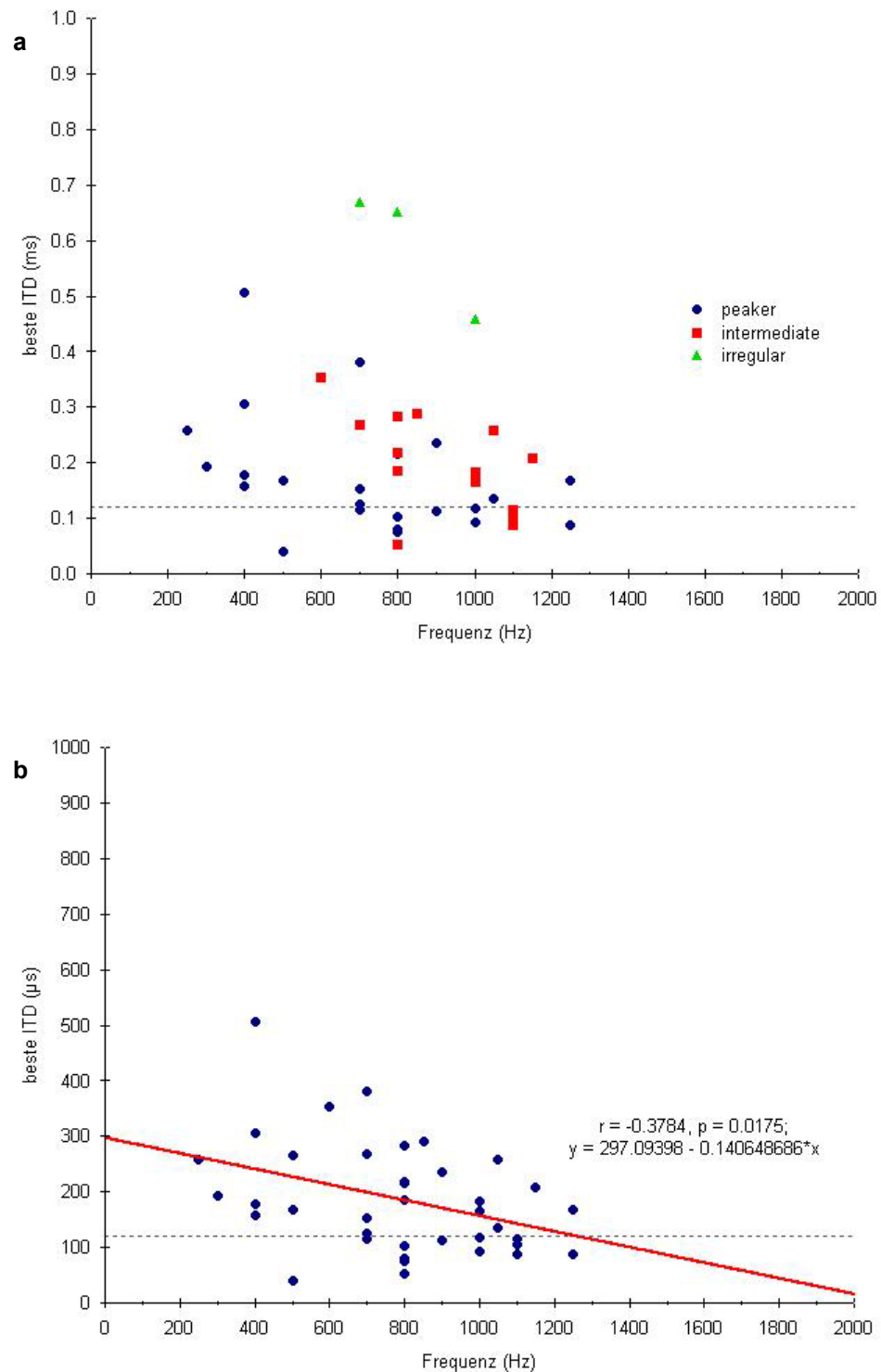


Abbildung 59 Beste ITD an der BF versus Frequenz Plot für alle ITD-sensitiven Zellen

Mit sinkender BF wird die Verteilung der besten ITDs breiter und die besten ITDs erreichen größere Werte. **a**, ‚Peak‘- und ‚intermediate‘-type Neurone sind unspezifisch über die gesamte Population verteilt. **b**, Die besten ITDs steigen signifikant an mit sinkender BF. Nur die Neurone der Kontrollgruppe sind in dieser Verteilung enthalten.

Die Diagramme in Abbildung 60 und Abbildung 61 wurden dargestellt um sie mit Daten aus dem IC des Meerschweinchens zu vergleichen (McAlpine et al., 1996). In Abbildung 60 sind Histogramme der Verteilungen von CD und CP gezeigt. Der Mittelwert der CDs liegt bei $+174,74 \mu\text{s}$ und 45 % der Neurone hatten CDs außerhalb $\pm 120 \mu\text{s}$. Die Verteilung der CPs zeigte einen Mittelwert von 0,032 Zyklen, und 50 % der Zellen hatten CPs innerhalb von $\pm 0,1$ Zyklen, was darauf hinweist, dass ihre CDs nahe bei dem Maximum der ITD-Funktionen waren.

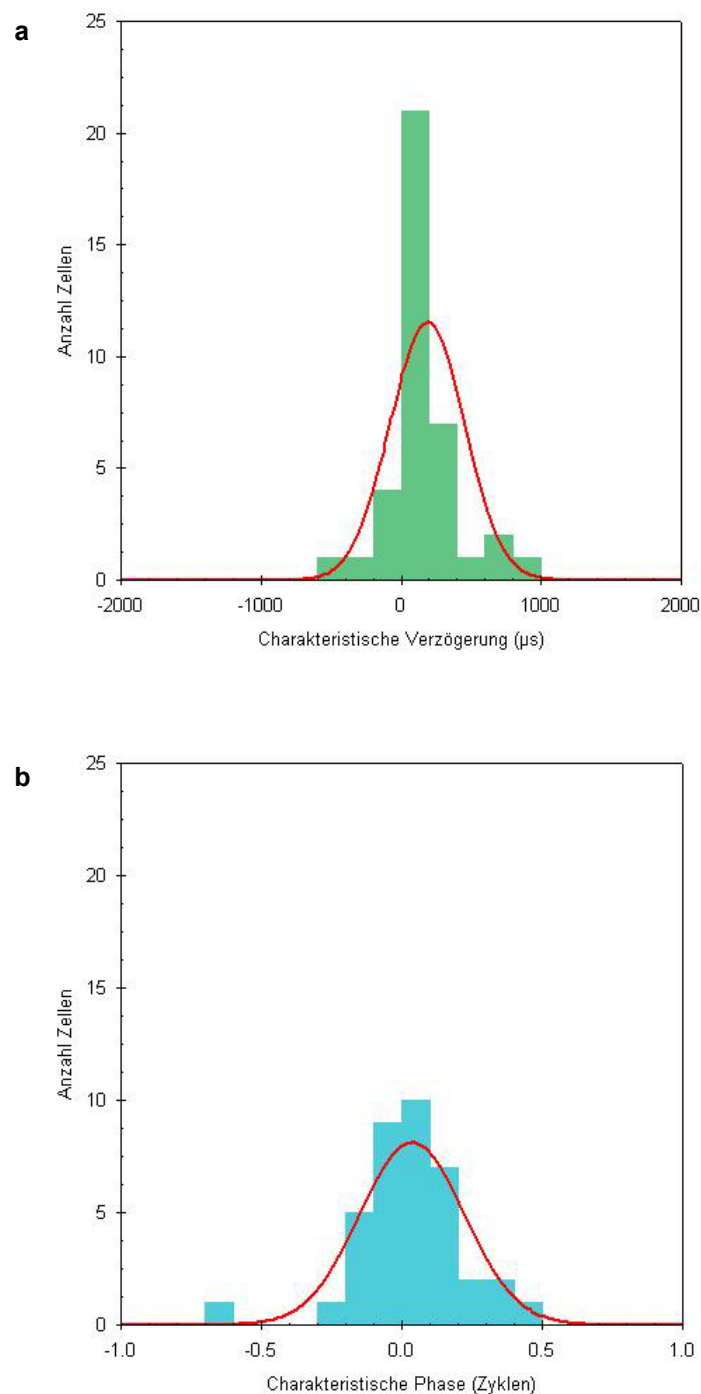


Abbildung 60 (vorherige Seite) Verteilung von CD und CP

a, Verteilung der charakteristischen Verzögerung. **b**, Verteilung der charakteristischen Phase. Beide Histogramme mit den normalverteilten Anpassungskurven. Beschreibung siehe Text.

In Abbildung 61 ist CD als Funktion von CP aufgetragen. Die CP gibt die Position der charakteristischen Verzögerung (CD) an. Abbildung 61 zeigt, dass die CDs zunehmend negativ werden, wenn die CP sich von Werten um 0 hin zu Werten von ‚trough-type‘ Neuronen (CP um 0,5 IPD) ändert.

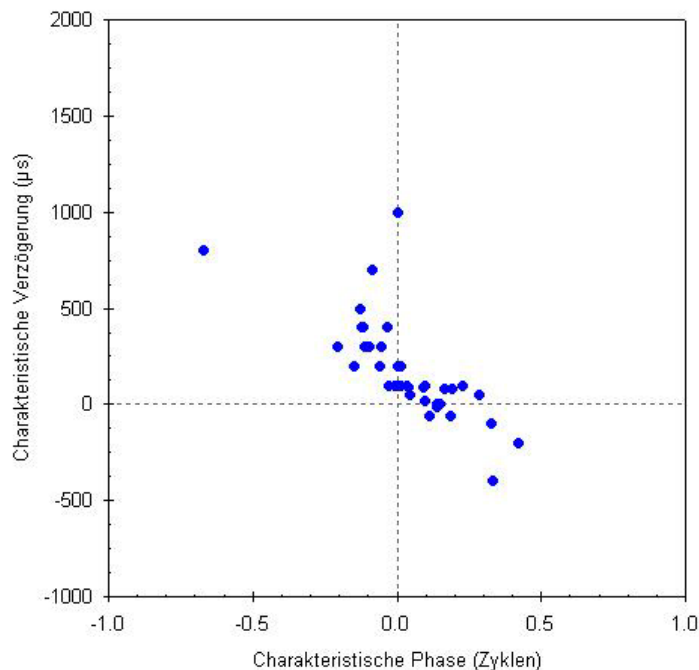


Abbildung 61 CD versus CP

Die CD als Funktion der CP zeigt, dass die CDs mit zunehmend negativen CPs größer werden.

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass es ITD-sensitive Zellen im DNLL gibt, die durch CP und CD charakterisiert werden können.

4.3.3 ONSET- VERSUS ONGOING-KOMPONENTE

Die Neurone im auditorischen Stammhirn können entweder nur am Anfang des akustischen Stimulus oder auch noch während des Stimulus antworten (‚onset‘ oder ‚ongoing‘). Von den 39 ITD-sensitiven Zellen der Kontrollgruppe zeigten 28 (72%) neben der Antwort auf den Anfang des Stimulus auch noch eine anhaltende Reaktion,

die sogenannte ‚ongoing‘ Komponente. Die besten IPDs der Onset- bzw Ongoing-Komponenten unterschieden sich nicht stark (Abbildung 62). Die mittlere Abweichung (beste IPD an der BF Onset minus Ongoing) betrug 0.0044 Zyklen. Bei Zellen mit der größeren besten IPD in der Onset-Antwort war diese im Schnitt 0,040 Zyklen größer, bei Zellen mit kleinerer bester IPD im Mittel 0,034 Zyklen kleiner als die der Ongoing-Komponente.

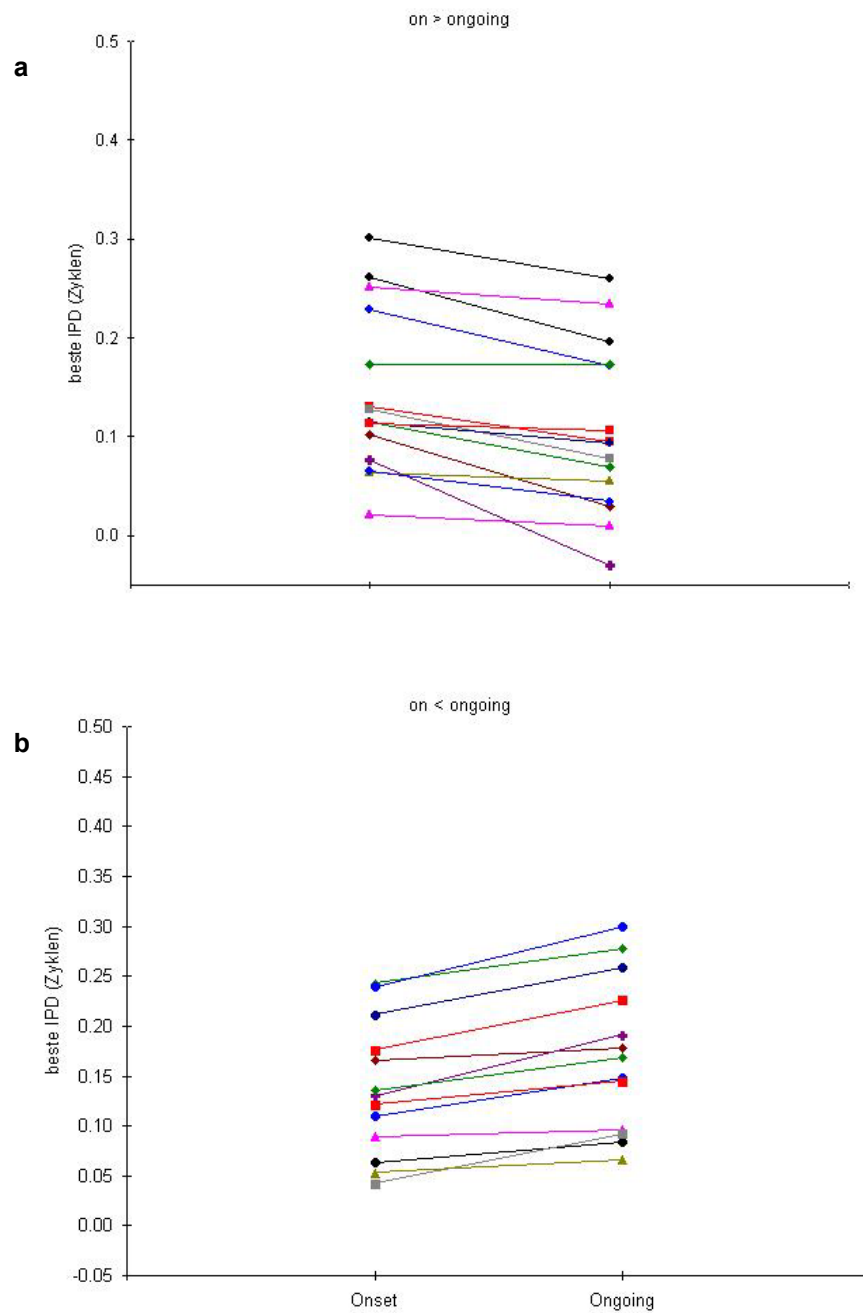


Abbildung 62 (vorherige Seite) Verhältnis Onset- versus Ongoing-Komponente

Die beste IPD von Onset- und Ongoing-Komponente unterscheiden sich nur leicht. **a**, In 15 von 28 Zellen ist die beste IPD der Ongoing-Komponente kleiner als die der Onset-Komponente. **b**, In 13 Zellen ist die beste IPD der Onset-Antwort kleiner. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die beiden Zellgruppen in zwei Diagramme aufgespalten.

Es gibt also Unterschiede in der besten IPD der Onset- Ongoingkomponente, aber diese Unterschiede bilden ein Kontinuum und sind nicht systematisch.

4.3.4 EINFLUSS DER STIMULUSAMPLITUDE AUF DIE ITD-FUNKTIONEN

Bei 10 der 39 Zellen der Kontrollgruppe wurden ITD-Funktionen an der Bestfrequenz bei verschiedenen Stimulusamplituden gemessen. Damit sollte die Amplitudenabhängigkeit der ITD-Sensitivität untersucht werden. Die Stimulusamplituden sind immer relativ zur Schwelle der Neuronen angegeben. Die ITD-Funktionen wurden grundsätzlich 20 dB über der Schwelle gemessen.

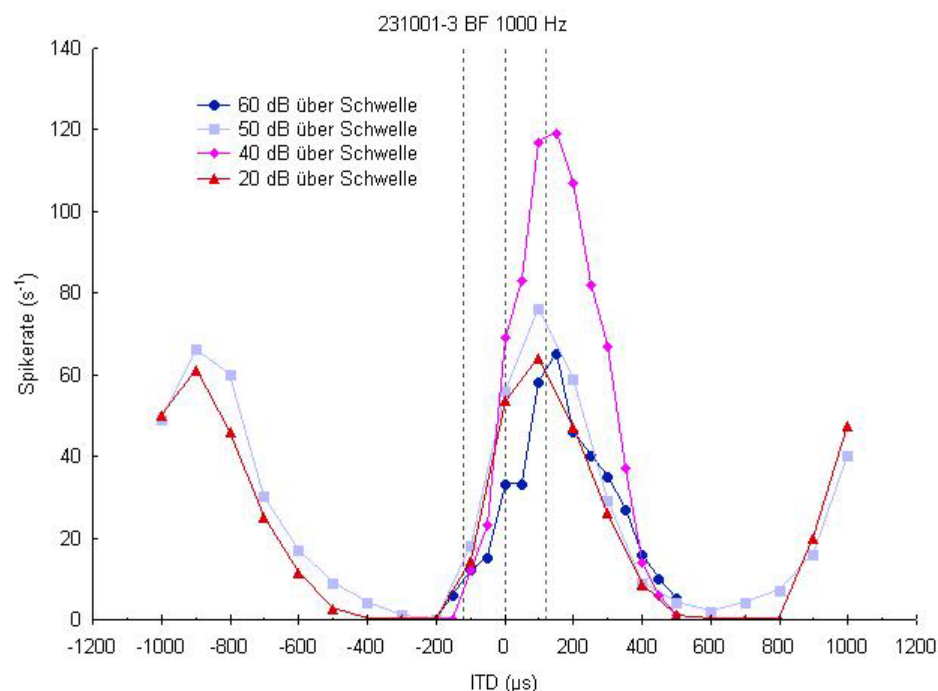


Abbildung 63 ITD-Funktionen einer Zelle bei unterschiedlichen Stimulusamplituden

Die ITD-Sensitivität dieser Zelle wurde bei verschiedenen Amplituden gemessen. Die Lautstärken der Stimuli sind relativ zur Reizschwelle angegeben. Bei einer Erhöhung der Amplitude von 20 auf 40 dB über der Schwelle nimmt die Spikerate an der besten ITD erst um fast 100% zu. Bei einer weiteren Erhöhung um 20 dB nimmt die Antwortrate bis auf den Wert bei 20 dB über der Schwelle ab.

Abbildung 63 zeigt eine Zelle, deren ITD-Sensitivität bei verschiedenen Amplituden gemessen wurde. Bei Zunahme der Amplitude über 20 dB über der Schwelle verdoppelt die Spikerate an der besten ITD zunächst (siehe bei 40 dB über der Schwelle). Bei einer weiteren Erhöhung der Amplitude sinkt die Spikerate wieder auf das Niveau von 20 dB über der Schwelle.

Die beste ITD der ITD-Sensitivität ändert sich nur geringfügig mit wechselnder Amplitude. In Abbildung 64 ist die beste ITD als Funktion der Stimulusamplitude aufgetragen. Anhand der Regressionsgerade wird deutlich, dass der Wert für die beste IPD leicht mit zunehmender Amplitude des Stimulus steigt.

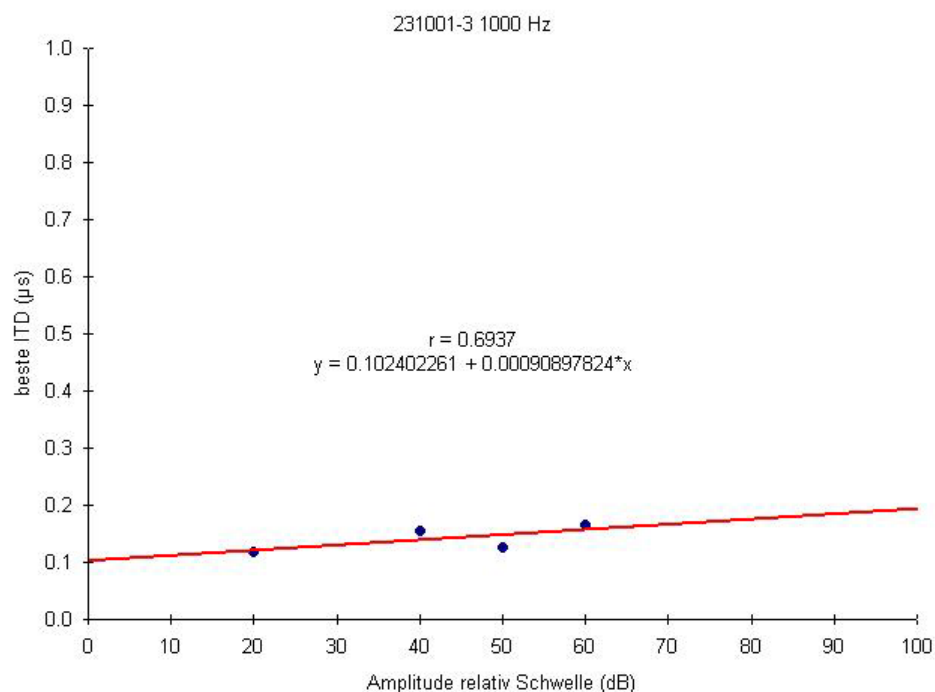


Abbildung 64 Beste ITD als Funktion der Stimulusamplitude

Mit zunehmender Amplitude des Stimulus erhöht sich die beste IPD dieser Zelle. Die Steigung der Regressionsgerade gibt an, dass die beste IPD um durchschnittlich 0,009 Zyklen pro 10 dB Amplitudenerhöhung zunimmt.

In Tabelle 1 sind die Funktionsgleichungen der Regressionsgeraden der besten IPDs der bei verschiedenen Frequenzen gemessenen ITD-Funktionen von 10 Zellen aufgetragen. 7 der 10 Zellen zeigen im Mittel eine Erhöhung der besten IPD mit zunehmender Amplitude (0,025 Zyklen pro 10 dB Amplitudenänderung). Bei 3 der 7 Zellen der Zellen liegt die mittlere Änderung der besten IPD jedoch unter 0,01 Zyklen pro 10 dB Amplitudenänderung.

Zelle	Bestfrequenz	Binauralität	ITD-Charakteristik	Steigung	Mittlere IPD- Änderung in Zyklen pro 10 dB Amplitudenerhöhung
Beste IPD grösser mit zunehmender Amplitude					
231001-3	1000	EE		0.000909	0.00909
251001-3	1100	EE		0.000270	0.002699
131201-2	1000	Ee		0.007512	0.07512
171201-9	400	Ee		0.004081	0.04081
030102-6	600	EE		0.001179	0.01179
080602-4	1050	-		0.003235	0.03235
080602-6	1000	-		0.000167	0.00167
				Mittelwert	0.02479
				STDEV	0.026724
				n	7
				S.E.M.	0.010101
Beste IPD kleiner mit zunehmender Amplitude					
131201-10	500	EE		-0.000758	-0.00758
071102-4	800	-		-0.003476	-0.03476
071802-2	850	-		-0.001196	-0.01196
				Mittelwert	-0.0181
				STDEV	0.014593
				n	3
				S.E.M.	0.008425

Tabelle 1 Regressionsgeraden der besten IPDs in Abhängigkeit zur Stimulusamplitude
 7 der 10 Zellen zeigen im Mittel eine Erhöhung der besten IPD mit zunehmender Amplitude. Bei 3 dieser 7 der Zellen liegt die mittlere Änderung der IPD jedoch unter 0,01 Zyklen pro 10 dB Amplitudenänderung. Bei 3 der 10 Zellen wird die beste IPD mit einer Erhöhung der Amplitude kleiner, bei einer dieser Zellen um weniger als 0,01 Zyklen pro 10 dB Änderung.

Um nicht nur die beste IPD, sondern auch die Lage der maximalen Steigung der ITD-Funktion im physiologischen Bereich bei verschiedenen Stimulusamplituden zu überprüfen, wurden die ITDs der maximalen Steigungen bei den unterschiedlichen Stimulusamplituden aufgetragen (Abbildung 65).

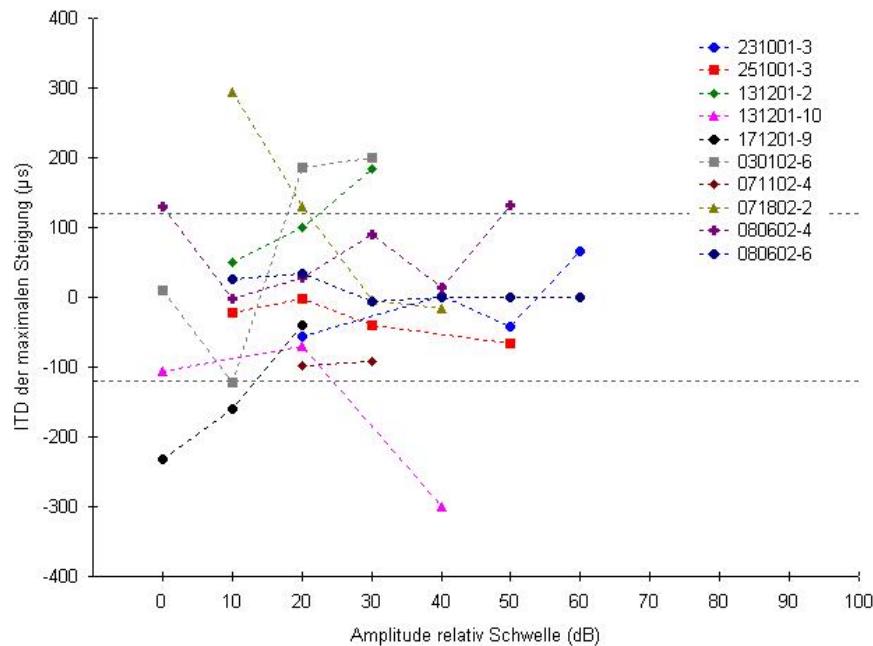


Abbildung 65 Maximale Steigung als Funktion der Stimulusamplitude

Maximale Steigungen der ITD-Funktionen bei verschiedenen Amplituden. 0 dB Abschwächung entspricht dem Kontrollwert 20 dB über der Schwelle. Die grau gestrichelten Linien in **a** beschreiben den physiologisch relevanten Bereich. **b** zeigt, dass sich die Lage der maximalen Steigungen bei 8 der 10 Zellen nur unwesentlich mit einer Amplitudenerhöhung bzw. -erniedrigung verändert. Bei zwei Zellen schwankt die ITD der maximalen Steigung jedoch stark, bleibt aber meistens im physiologischen Bereich (siehe **a**).

Weiter wurde die Änderung der Spikerate in Abhängigkeit zur Stimulusamplitude untersucht. In Abbildung 66 sind die normalisierten Spikeraten in Antwort auf die beste ITD an der BF aller bei verschiedenen Amplituden gemessenen Zellen im Verhältnis zur Amplitude aufgetragen. Alle Spikeraten sind zu der Spikerate 20 dB über der Schwelle normalisiert. Bei 7 von 8 Zellen sinkt die Spikerate, wenn die Amplitude unter den Kontrollwert abgesenkt wird. Bei 3 Zellen stieg die Antwortrate zunächst an wenn die Amplitude über den Kontrollwert stieg, wobei sie bei zwei Zellen, bei denen die Amplitude weiter erhöht wurde, wieder auf ein Kontrollwert-Niveau absank. Die Spikerate von 5 Zellen, bei denen die Amplitude über den Kontrollwert erhöht wurde, stieg nicht weiter an bzw. reduzierte sich.

Insgesamt zeigten sich bei allen Zellen, deren ITD-Funktionen bei mehr als drei verschiedenen Amplituden gemessen wurden, nicht-monotone Antwortraten. Nur bei Zelle 131201-2 steigt die Spikerate an der besten ITD mit zunehmender Amplitude an, wobei aber ungeklärt bleibt, ob auch hier die Spikerate bei einer weiteren Erhöhung der Amplitude wieder sinkt (vgl. Zellen 231001-3 und 080602-6).

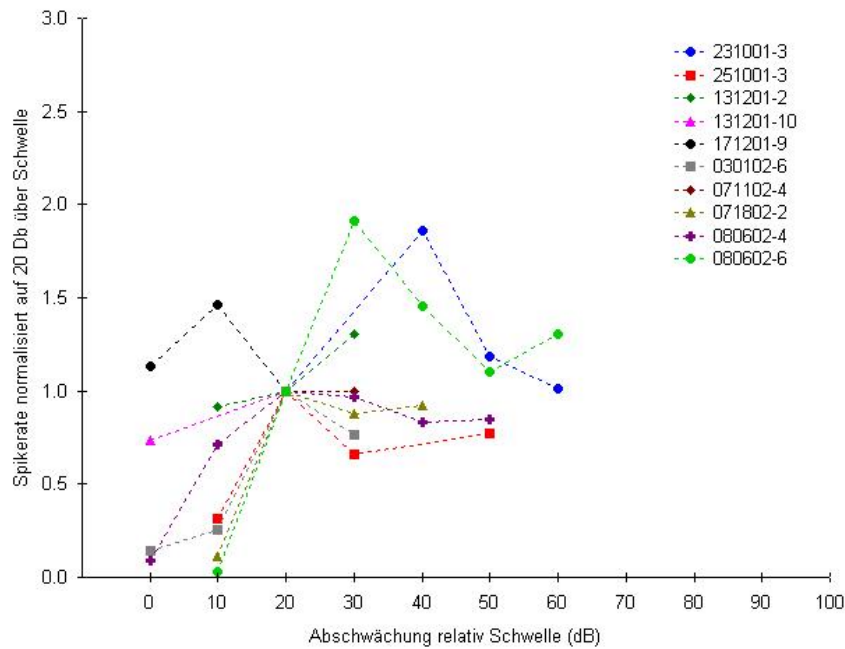


Abbildung 66 Antwortrate relativ zur Stimulusamplitude

Hier ist die Antwortrate als Funktion der Amplitude relativ zur Reizschwelle aufgetragen. Bei zwei Zellen erhöht sich die Antwortrate zunächst, wenn die Amplitude über den Kontrollwert steigt, sinkt jedoch bei einer weiteren Erhöhung auf ein der Kontrollrate vergleichbares Niveau. Bei 7 der 10 Zellen erhöht sich die Spike-Rate nicht, wenn die Amplitude über den Kontrollwert steigt. Außer bei einer Zelle liegen die Antwortraten für Amplituden unter 20 dB über der Schwelle unter dem Wert an der Schwelle.

Um die Monotonie der Zellen quantitativ zu untersuchen, wurde die Spikerate in Antwort auf die beste ITD bei der größten Amplitudenintensität durch die insgesamt höchste Spikerate geteilt (vgl. Park et al, 2003; Abbildung 67). 6 von 10 Zellen sind nicht 100 % monoton und in dieser Population findet sich kein Beispiel für eine Monotonie unter 50 %.

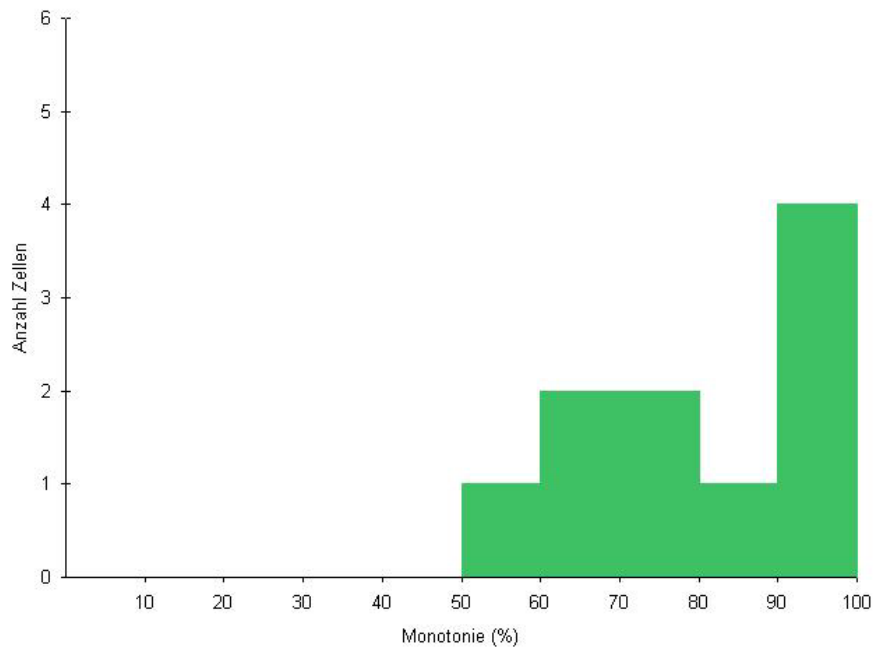


Abbildung 67 Monotonie der Spikerate der besten ITD

6 von 10 Zellen zeigen eine Monotonie von unter 90 %, es fehlen aber Beispiele mit einer Monotonie unter 50 %.

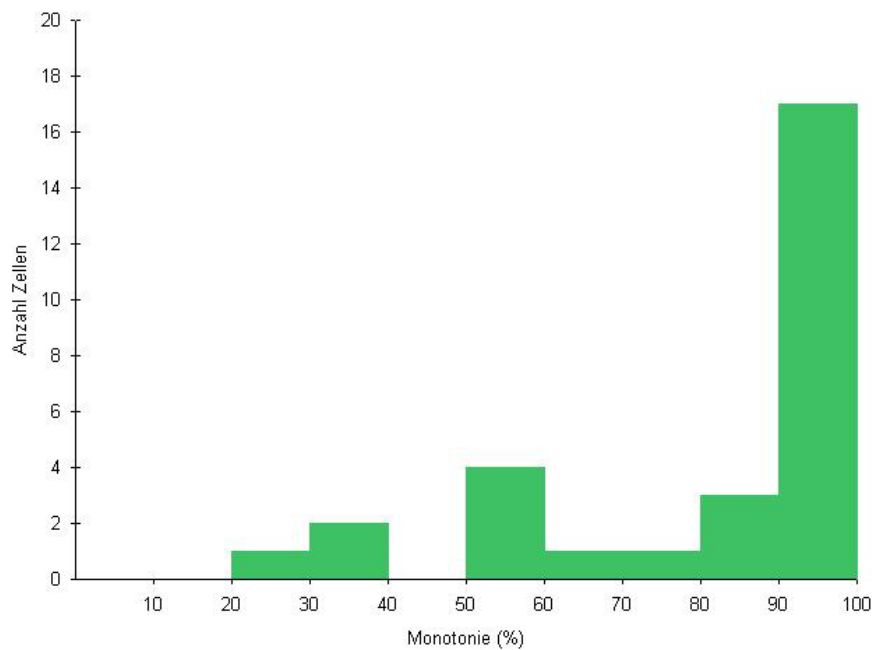
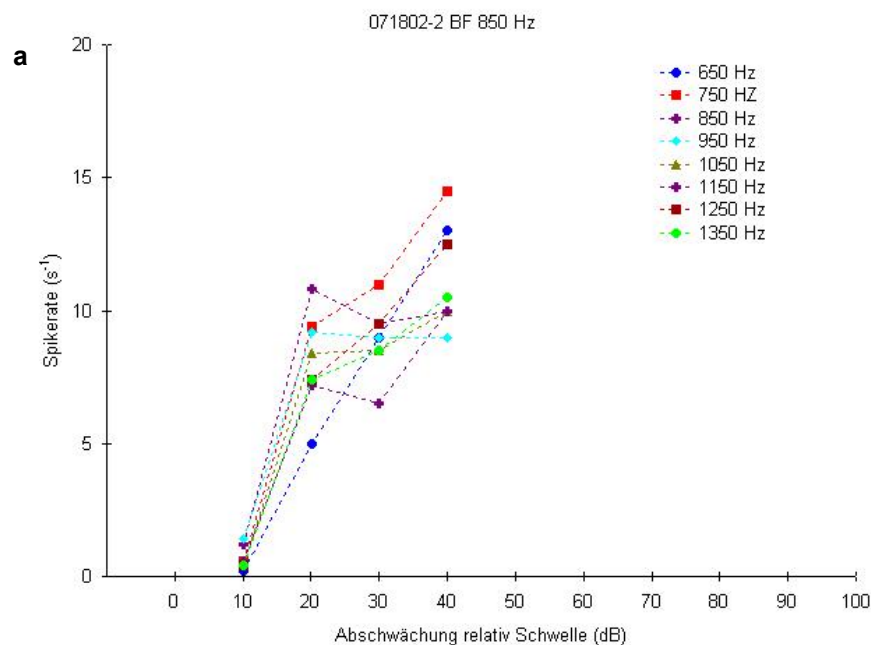


Abbildung 68 Monotonie der binauralen Ratenintensitätsfunktionen

41 % der Zellen zeigen eine Monotonie von unter 90 % (Def. siehe Text), d.h. ein signifikanter Anteil an Neuronen zeigt eine nicht-monotone Antwortratensteigerung mit Amplitudenerhöhung.

Bei 29 ITD-sensitiven Zellen wurden an der BF (± 50 Hz) bei einer ITD von 0 Ratenintensitätsfunktionen gemessen und auf ihre Monotonie hin untersucht (Abbildung 68). 41 % der Zellen zeigten eine Monotonie von unter 90 %, 10% sogar eine unter 50 %. Damit zeigt also ein großer Anteil von Zellen eine nicht-monotone Antwortratensteigerung. Jedoch ist der Anteil an 100 % monotonen Antworten größer im Vergleich zur Bewertung der Antworten auf die beste ITD (Abbildung 67).

Außerdem wurde die Spikerate der besten ITD mit sich ändernder Amplitude bei verschiedenen Frequenzen gemessen. Abbildung 69 zeigt die Beispiele von zwei Zellen. Insgesamt zeigt die Spikerate auch bei anderen Frequenzen eine ähnliche Änderung relativ zur Amplitude.



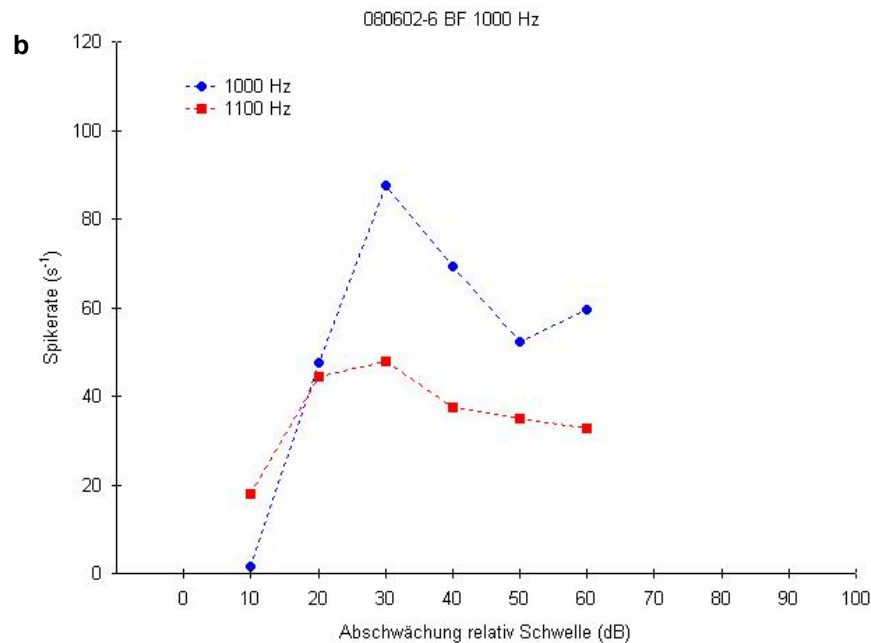


Abbildung 69 Spikerate der besten ITD versus Amplitude bei verschiedenen Frequenzen

Bei diesen beiden Zellen wurden neben der Bestfrequenz noch für andere Frequenzen bei verschiedenen Amplituden ITD-Funktionen gemessen. Das Verhältnis der Antwortrate zur Stimulusamplitude ist jedoch für alle Frequenzen relativ ähnlich. Während bei **a** die Antwortrate eher gleichmäßig zunimmt, erreicht sie in **b** 10 dB über dem Kontrollwert ihren Höhepunkt und sinkt dann weiter ab.

Abbildung 70 zeigt die Analyse der besten IPD der Onset- und Ongoingkomponenten im Vergleich zur Gesamtantwort bei verschiedenen Stimulusamplituden. 8 der 10 bei verschiedenen Amplituden auf ITD-Sensitivität gemessenen Zellen wiesen eine Ongoing-Komponente in der Antwort auf. Bei einigen Zellen verändert sich die beste IPD der On- und Ongoing-Komponente gleichförmig in Abhängigkeit zur Amplitude (**a**, **b**, **c** und **e**). Bei anderen Zellen (**d**, **f**, **g** und **h**) hingegen fällt ein zunehmender Unterschied zwischen den besten IPDs der beiden Antwortbestandteile bei größer werdender Amplitude auf. Allerdings wird nicht immer ein Bestandteil größer als der andere. Bei den Zellen in **d** und **h** z.B. nimmt die beste IPD der Onset-Komponente bei großen Amplituden zu, bei der Zelle in **f** wird das Verhältnis beste IPD Onset- versus Ongoing-Komponente mit zunehmender Amplitude kleiner.

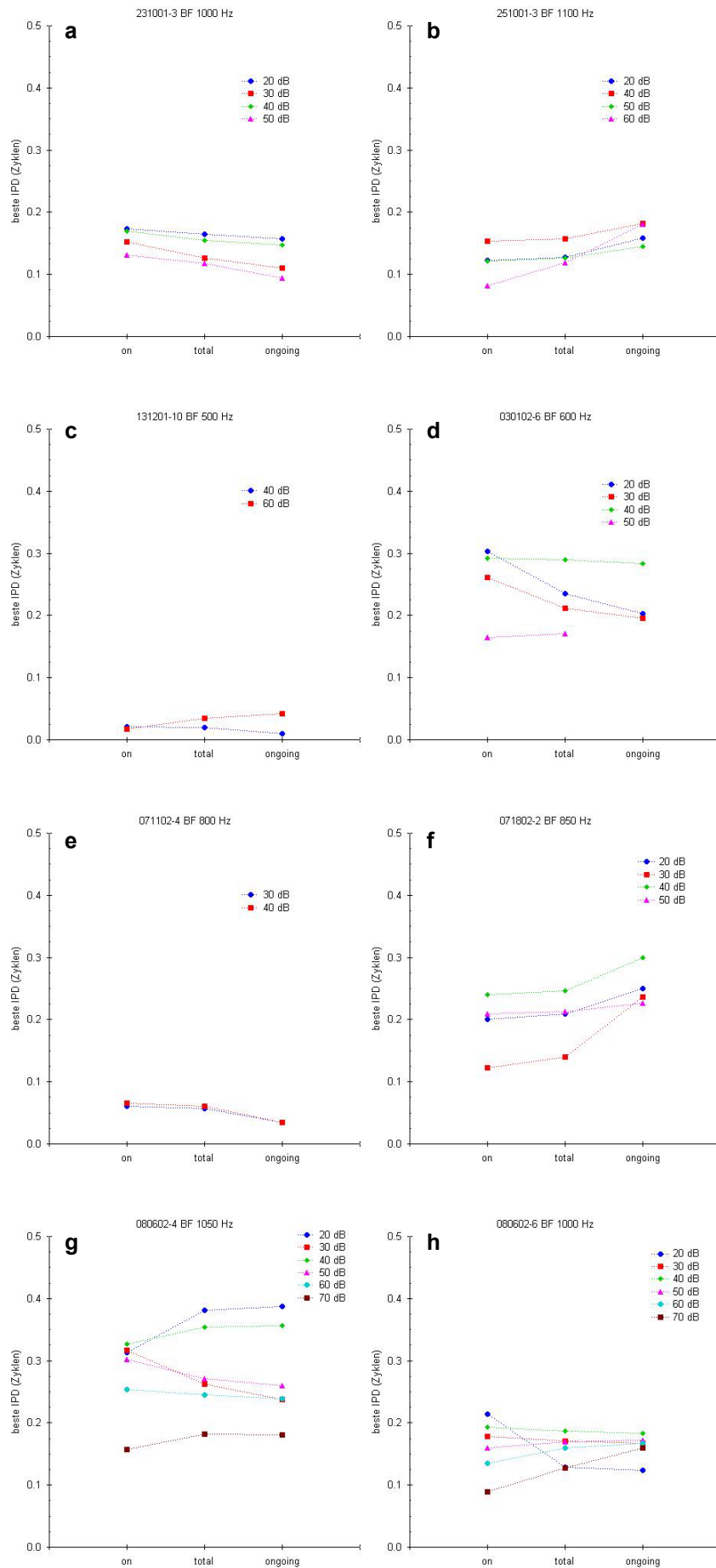


Abbildung 70 (vorherige Seite) Beste IPD der verschiedenen Antwortbestandteile

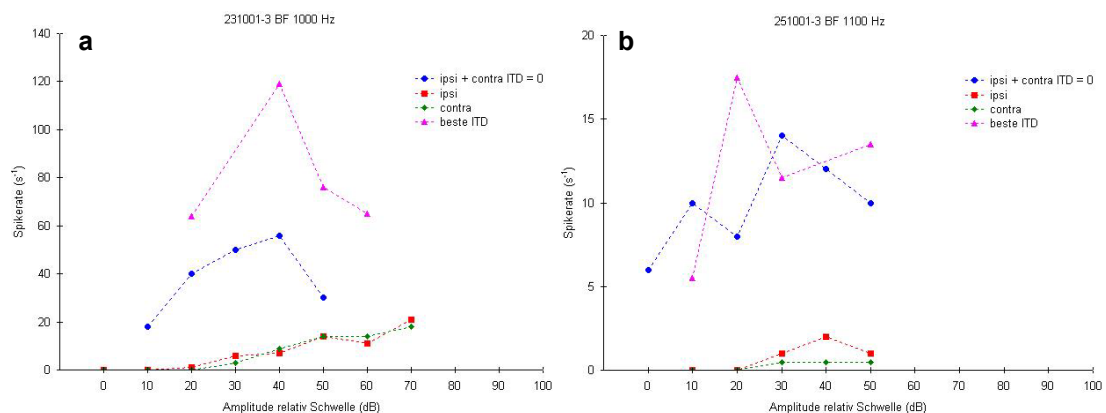
Die einzelnen Abbildungen zeigen die besten IPDs der Gesamtantwort, sowie der Onset- und Ongoing-Komponente. Während sich bei einigen Zellen die beste IPD der Onset- und Ongoing-Komponente gleichförmig in Abhängigkeit zur Amplitude verändern (**a**, **b**, **c** und **e**), zeigt sich bei anderen Zellen (**d**, **f**, **g** und **h**) ein zunehmender Unterschied zwischen den besten IPDs der beiden Antwortbestandteile bei sich verändernder Amplitude.

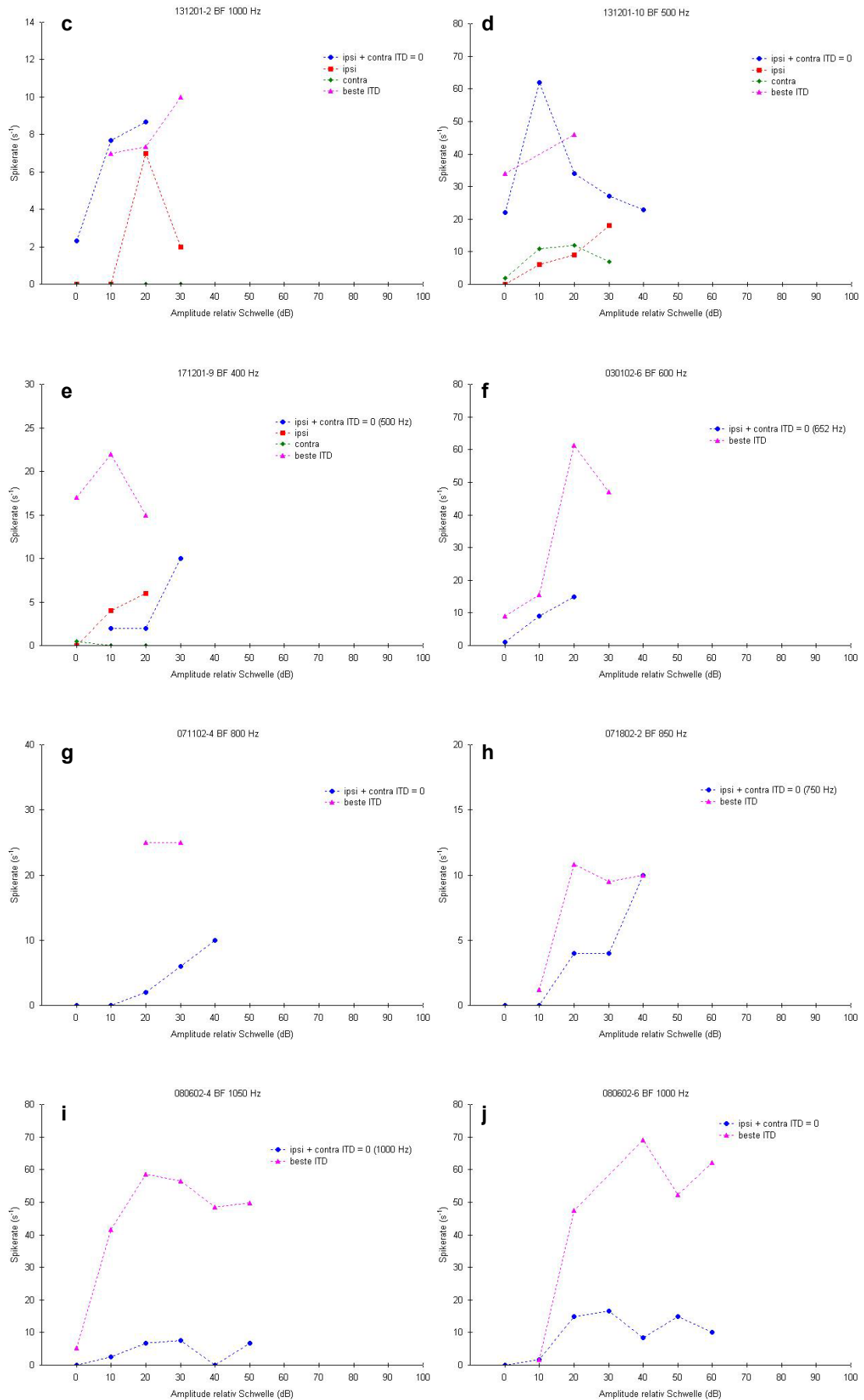
Zusammenfassend kann man feststellen, dass das Antwortverhalten von ITD-sensitiven DNLL-Zellen bei einer Amplitudenerhöhung komplex ist. Ein großer Teil der Neurone reagiert nicht monoton, sowohl bei 0 ITD als auch an der besten ITD. Bei der Analyse der Onset- und Ongoingkomponente zeigt sich, dass es bei einigen Zellen einen größeren Unterschied mit zunehmender Amplitude gibt, bei anderen hingegen das Verhältnis gleich bleibt. Mit den hier vorgelegten Daten kann man keine systematische Verschiebung der besten ITD mit zunehmender Amplitude beobachten.

4.3.5 RATENINTENSITÄTSFUNKTIONEN UND INTERAURALE INTENSITÄTSDIFFERENZEN

Die Spikerate einer gegebenen ITD ist in der Regel nicht monoton (Kapitel 4.3.4). Um diese Nicht-Monotonie weiter zu untersuchen, wurden ITD-sensitive DNLL-Zellen auf binaurale und monaurale Ratenintensitätsfunktionen untersucht und mit der Spikerate für die beste ITD bei verschiedenen Amplituden verglichen.

In Abbildung 71 sind Beispiele für verschiedene Zellen dargestellt, in denen binaurale und monaurale Ratenintensitätsfunktionen, sowie die Spikerate der besten ITD bei verschiedenen Amplituden miteinander verglichen wurde.





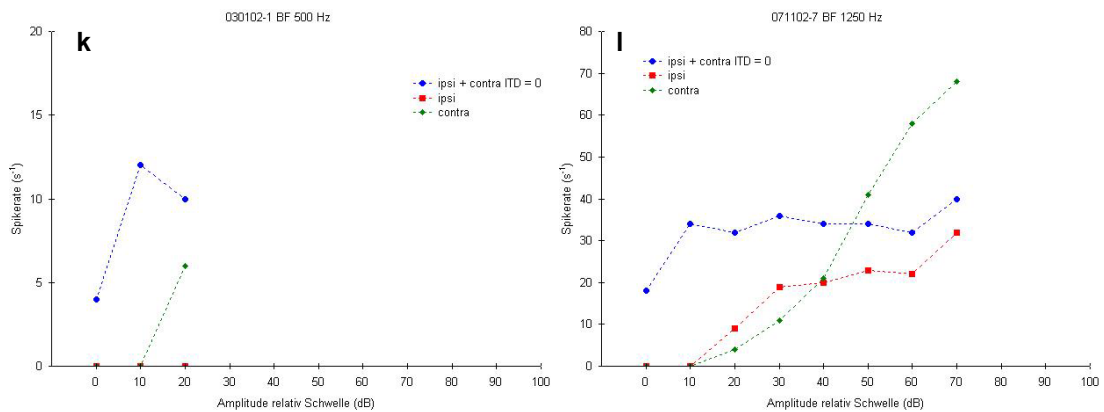


Abbildung 71 Monaurale und binaurale Ratenintensitätsfunktionen im Vergleich

Bei diesen Zellen wurden monaurale und binaurale Ratenintensitätsfunktionen und Spikeraten der besten ITD bei unterschiedlichen Amplituden miteinander verglichen. Bei allen Zellen außer in **e** ergibt sich 20 dB über der Schwelle eine höhere Antwort aus der binauralen Reizung. In der Mehrzahl der Fälle ist die binaurale Antwort nicht einfach eine Addition der monauralen Antworten.

Die Zelle in Abbildung 71a präsentiert sowohl bei der Spikerate der besten ITD, als auch bei der binauralen Ratenintensitätsfunktion deutlich ein nicht-monotones Verhalten. Die Spikerate der besten ITD liegt immer höher als die der binaural erzeugten Ratenintensitätsfunktion. Beide Kurven haben ihr Maximum 40 dB über der Schwelle der Zelle und fallen bei einer weiteren Erhöhung der Amplitude drastisch ab. Die monauralen Ratenintensitätsfunktionen bleiben weit unter der binauralen Antwort und zeigen monotonen Verhalten. Interessanterweise entspricht die binaurale Antwort nicht einer Addition der monauralen Antworten und zeigt auch nicht die gleiche Monotonie. Die binaurale Antwort ist bei allen abgebildeten Zellen höher als die monaurale, außer bei den Zelle in **l**. Hier übersteigt die contralaterale Antwort die ipsilaterale ab 50 dB über der Schwelle.

Zwei Zellen konnten bei Reizung von ausschließlich contralateral (Abbildung 71c und e) bzw. ipsilateral (Abbildung 71k) nicht erregt werden.

Weitere Beispiele für nicht-monotone Antworteigenschaften finden sich in Abbildung 71b, e, f, h, i und j (beste ITD), sowie in Abbildung 71b, d, i und j (binaurale Ratenintensitätsfunktion). Einige Neurone stagnieren mit ihren Antwortraten bei einer Amplitudenerhöhung, so z.B. die binaural und die ipsilateral induzierte Spikerate in Abbildung 71l.

In Abbildung 72 sind die IID-Funktionen von zwei ITD-sensitiven DNLL-Neuronen dargestellt. In dem Beispiel von Abbildung 72a wurde jeweils eine Seite auf eine Stimulusamplitude 30 dB über der Schwelle eingestellt und die andere Seite

zwischen 10 bis 50 dB über der Schwelle variiert. Wenn beide Seiten auf die gleiche Lautstärke eingestellt sind, zeigt die Zelle die stärkste Antwort. Wenn die ipsilaterale Amplitude fest eingestellt ist und die contralaterale über deren Wert erhöht wird, so kommt es zu einer drastischen Erniedrigung, also Hemmung, der Spikerate. Bei der umgekehrten Konstellation ist dies ebenso der Fall, jedoch weniger dramatisch.

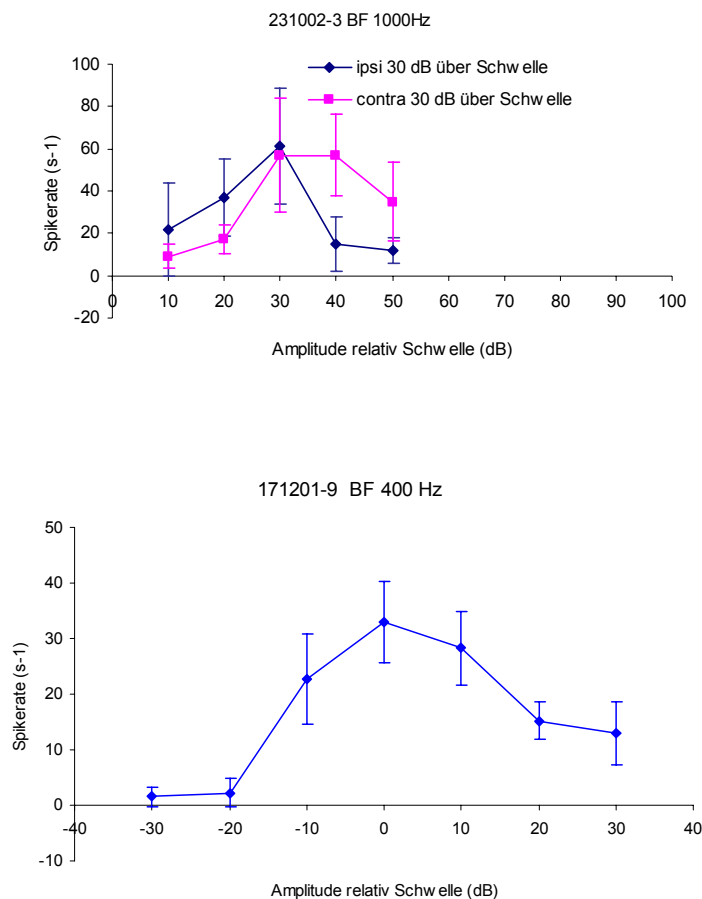


Abbildung 72 Interaurale Intensitätsdifferenzen bei ITD-sensitiven DNLL-Neuronen

a, Während die Lautstärke auf einer Seite fest eingestellt war, variierte die andere. Beide IID-Funktionen haben ihr Maximum, wenn beide Seiten mit der gleichen Amplitude gereizt werden. Wird die Amplitude einer Seite weiter erhöht, fällt die Spikerate. Wiederholungen: 10, Fehlerbalken: Mittlere Standardabweichung. **a**, Die stärkste Antwort wird induziert, wenn die Amplitude auf beiden Seiten gleich ist. Ist die contralaterale Stimulation schwächer oder stärker so sinkt die Antwortrate. Fehlerbalken: mittlere Standardabweichung.

In Abbildung 72b findet sich ebenfalls Evidenz für Inhibition. Hier ist die Amplitude am ipsilateralen Ohr auf 10 dB über der Schwelle eingestellt und die contralaterale Amplitude wechselt in 10 dB Schritten zwischen 30 dB unter bzw. über der Schwelle. Wiederum zeigt die Zelle die stärkste Antwort bei gleicher Intensität beider Eingänge.

Ist die contralaterale Stimulation schwächer oder stärker als die ipsilaterale Stimulation, so sinkt die Antwortrate.

Durch die hier gezeigten Beispiele wird deutlich, dass die binaurale Antwort keine Addition der monauralen Antworten darstellt. Ebenso ist die in zwei ITD-sensitiven Zellen gefundene IID-Sensitivität ein Hinweis auf inhibitorische Komponenten im Antwortmuster von DNLL-Neuronen.

4.3.6 ITD-SENSITIVITÄT IM DNLL UND MSO IM VERGLEICH

Wir untersuchten die ITD-Sensitivität von einzelnen Neuronen im DNLL, da Ableitungen in der MSO wiederholt als sehr schwierig beschrieben wurden (Goldberg and Brown, 1969; Yin and Chan, 1990; Spitzer and Semple, 1995). Der DNLL erhält direkte exzitatorische Eingänge von MSO-Neuronen (Übersichtsarbeit Wu, 1999) und sollte daher deren ITD-Empfindlichkeit widerspiegeln. Wir berücksichtigten dabei nur Neurone, die eine BF von weniger als 2 kHz hatten, von beiden Seiten erregbar waren (E/E-Zellen) und/oder individuelle beste ITDs hatten, die frequenzunabhängig waren („peak-type“).

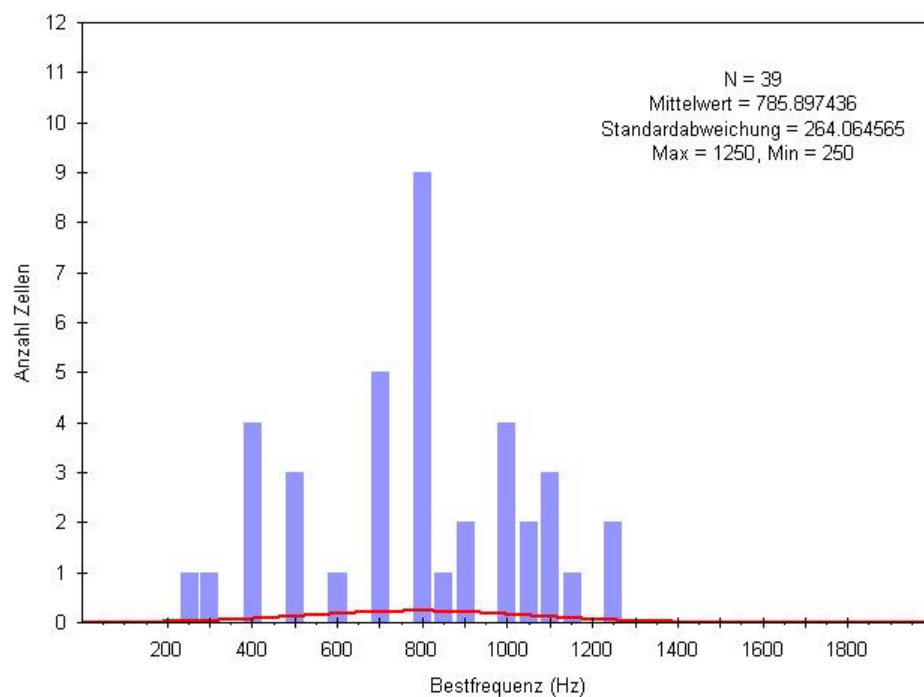


Abbildung 73 Verteilung der Bestfrequenzen der ITD-sensitiven Zellen der Kontrollgruppe
Die Bestfrequenzen der gemessenen Zellen in der Kontrollgruppe variierten von 250 Hz bis 1250 Hz um einen Mittelwert von knapp 800 Hz. Binweite 50 Hz.

Abbildung 73 zeigt die Verteilung der BF über die Population der 39 ITD-sensitiven Zellen der Kontrollgruppe (Minimum: 250 Hz, Maximum: 1250 Hz). Es wurden zwei Haupteigenschaften von ITD-Funktionen (vgl. Abbildung 74) der 39 DNLL-Neurone dieser Arbeit mit den 20 MSO-Neuronen einer anderen Studie (Brand et al., 2002) verglichen.

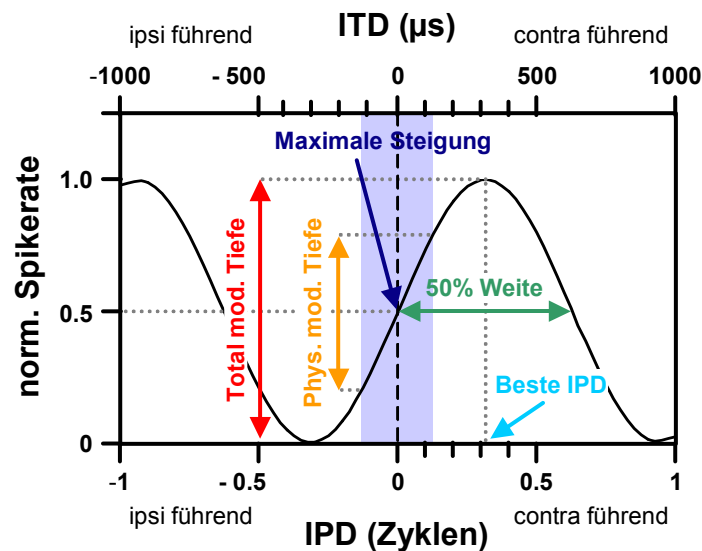


Abbildung 74 Haupteigenschaften von ITD-Funktionen

Neben der besten IPD (μs), wurde die Weite der ITD-Funktion an der 50 % Entladungsrate (50% Weite) in Zyklen, die absolute Modulationstiefe (Spikeratenänderung vom Minimum zum Maximum), die Modulationstiefe im physiologischen Bereich (blauer Bereich) und die Abszisse der maximalen Steigung (μs) gemessen.

Beide Populationen wurden bezüglich ihrer mittlere beste IPD (Def. IPD siehe 2.2.2; mittlere IPD vgl. Goldberg and Brown, 1969) und mittlere Modulationstiefe (maximale Antwortrate minus minimaler Antwortrate) über den Bereich der natürlich verarbeiteten ITDs einander verglichen (Tabelle 2).

	DNLL	MSO
Beste IPD	+0,137; $\pm 0,067$	+0,120; $\pm 0,047$
Physiologische Modulationstiefe	68,4%; $\pm 22,27$	47,4%; $\pm 19,55$

Tabelle 2 Vergleich DNLL/MSO auf beste IPD und physiologische Modulationstiefe

Der Vergleich von bester IPD und physiologischer Modulationstiefe zwischen ITD-sensitiven DNLL und MSO Zellen zeigt, dass der DNLL die Eigenschaften der MSO widerspiegelt. Werte der MSO sind entnommen aus (Brand et al., 2002).

Anhand dieses Vergleiches sieht man, dass sich die ITD-Funktionen der beiden Kerne prinzipiell gleichen. Der DNLL spiegelt die ITD-Sensitivität der MSO also gut wider.

Ein typisches Beispiel für ein ITD-sensitives Neuron des DNLL eines Tieres der Kontrollgruppe ist in Abbildung 75 gezeigt. Seine beste ITD war bei 118 μs ($= 0,12$ Zyklen des Stimulus an der BF, 1000 Hz) und die stärkste Steigung lag bei $-56 \mu\text{s}$, also deutlich innerhalb des Bereichs der physiologischen ITDs. Die maximalen Antworten bei verschiedenen Stimulusfrequenzen liegen bei etwa der gleichen ITD und zeigen, dass das Neuron dem 'peak-type' entspricht. Weiter wird das zyklische Antwortverhalten des Neurons bei allen gemessenen Frequenzen deutlich. Der Abstand der maximalen Antworten entspricht ungefähr der Phasenlänge des Stimulus. Man bemerke, dass der Abstand der Maxima 1100 Hz Stimulusfrequenz kleiner ist als bei 1000 Hz.

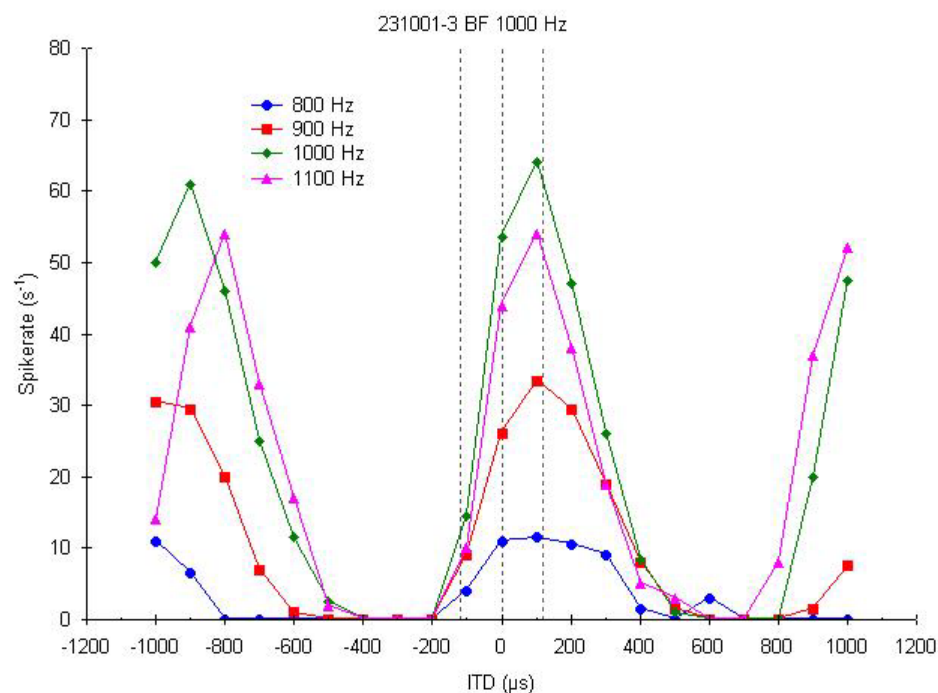


Abbildung 75 ITD-Funktion einer DNLL-Zelle

Ein Beispiel eines Neurons eines Kontrolltieres, das zeigt, dass die beste ITD unabhängig von der Stimulusfrequenz ist ('peak-type'). Die beste ITD dieser Zelle an der Bestfrequenz (1000 Hz) liegt bei 118 μs , was 0,12 Zyklen der BF entspricht. Werte an der BF ermittelt durch 20 Stimuluswiederholungen.

Für alle 39 untersuchten Neurone lag der Wert für die mittlere beste IPD an der Bestfrequenz bei +0,137 Zyklen (STDEV $\pm 0,067$) und die durchschnittliche Position der stärksten Steigung lag bei $-17 \mu\text{s}$ ($\pm 87,60$). In Abbildung 76 ist ein Plot aller ITD-

sensitiven DNLL-Zellen der Kontrollgruppe gezeigt. Hier wurden die ITD-Funktionen auf ihre IPD normalisiert (siehe 2.2.2). Die maximalen Steigungen der IPD-Funktionen liegen alle nahe 0.

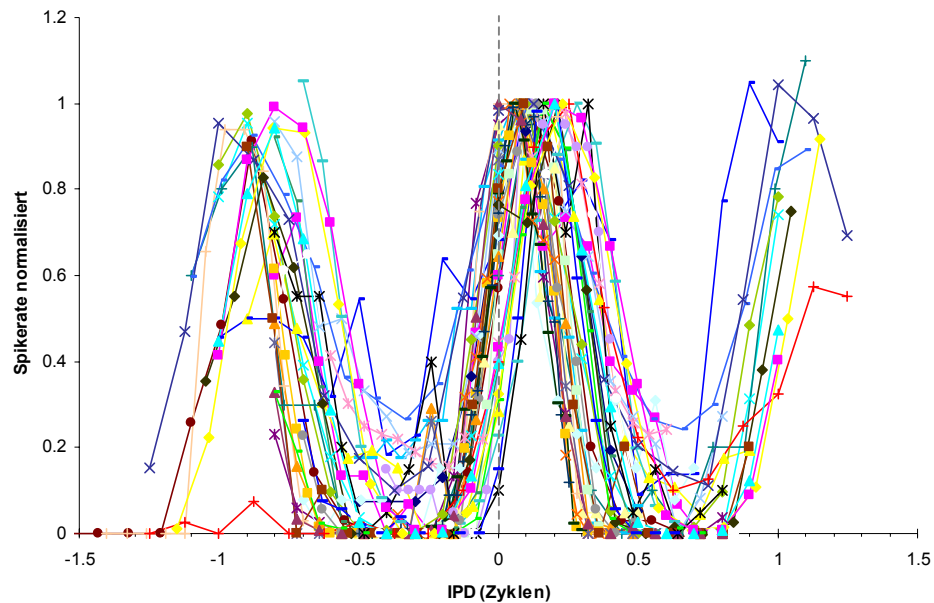


Abbildung 76 Spikerate als Funktion der IPD

IPDs von allen Neuronen an ihrer Bestfrequenz, die in Kontrolltieren abgeleitet wurden. Die maximalen Steigungen liegen nahe 0.

Die IPD-Funktionen zeigen eine deutliche Gruppierung um eine konstante beste IPD, die beste IPD ist also im wesentlichen unabhängig von der BF der einzelnen Zellen. Im DNLL waren die Maxima der ITD-Funktionen um eine beste IPD verteilt (siehe Tabelle 2 und Abbildung 77). Diese Beziehung findet sich auch in der MSO (Brand et al., 2002) und im IC (McAlpine et al., 2001). Die relative Phasenkonstanz der besten IPDs in Abhängigkeit von der BF spiegelt auch die Beziehung der besten ITDs und der BF wieder, die schon in Abbildung 59 gezeigt wurde. Neurone mit niedriger BF tendieren dazu, eine größere beste ITD zu haben, wobei Neurone mit hoher BF durchschnittlich kleinere beste ITDs haben. Außerdem zeigt nur ein Drittel der Neurone die maximale Antwort auf eine ITD im physiologischen Bereich (Abbildung 59, grau gestrichelte Linie).

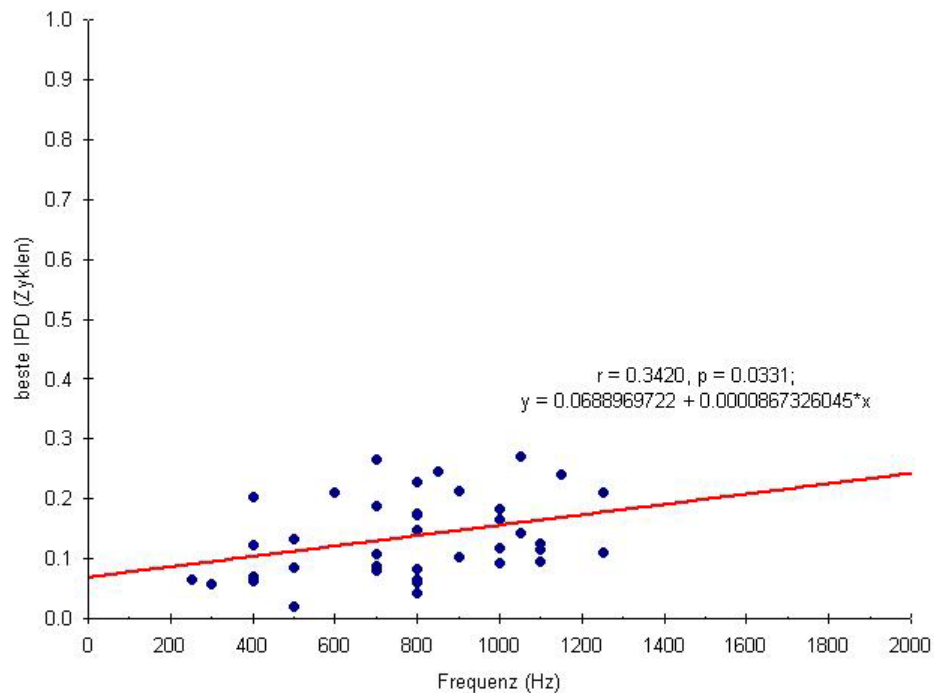


Abbildung 77 Beste IPD versus Bestfrequenz

Die besten IPDs an der BF aller Zellen wurden als Funktion der Stimulusfrequenz (BF) aufgetragen. Die besten IPDs orientieren sich um einen Mittelwert von 0,137 Zyklen. Vergleichbare Beziehungen zwischen bester IPD an der BF und der Stimulusfrequenz finden sich auch bei Brand et al. (Brand et al., 2002) und McAlpine et al. (McAlpine et al., 2001).

Die maximalen Steigungen der ITD-Funktionen bei Stimulation mit der BF der 39 in unsere Kontrollgruppe einbezogenen Zellen sind in Abbildung 78 gegen die Stimulationsfrequenz (= BF) aufgetragen.

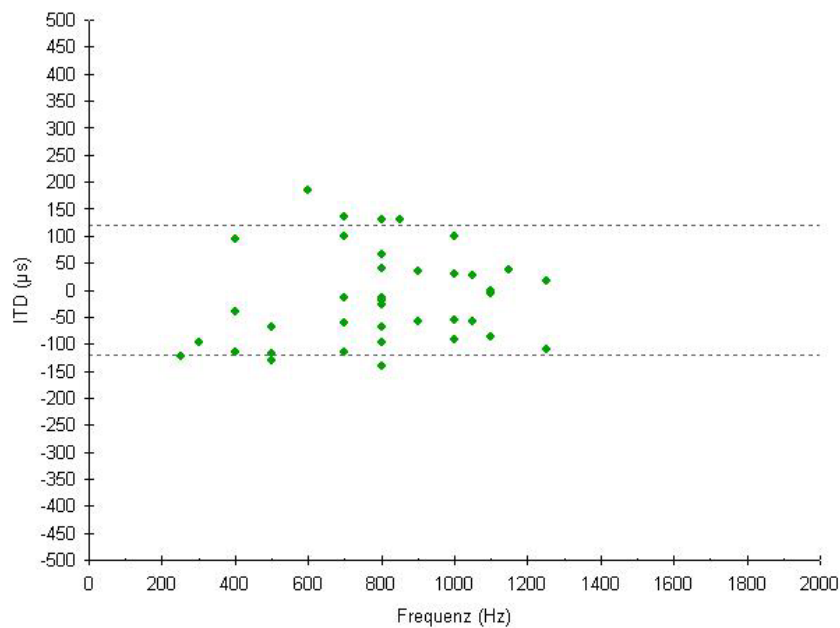


Abbildung 78 ITD der maximalen Steigungen in Kontrolltieren

Die maximalen Steigungen der ITD-Funktionen an der BF von Kontrolltieren gegen die Stimulationsfrequenz aufgetragen. Mehr als 80 % der maximalen Steigungen liegen innerhalb des physiologischen Bereiches (grau gestrichelte Linien).

Die Mehrzahl der Zellen ($> 80\%$) hat die maximale Steigung der ITD-Funktion innerhalb des physiologischen Bereiches (grau gestrichelte Linien).

Die ITD-Sensitivität im DNLL spiegelt die der MSO wider und kann dazu benutzt werden, um verschiedene Tiergruppen auf Unterschiede in der ITD-Verarbeitung zu vergleichen. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass die beobachtete ITD-Sensitivität einen anderen Ursprung hat als in der MSO. Tatsächlich verhindert eine Zerstörung der MSO die Fähigkeit zur Schalllokalisation im Azimut (Casseday and Neff, 1975), daher scheint die MSO der einzige Ursprung von ITD-Empfindlichkeit zu sein.

4.3.7 ITD-FUNKTIONEN IN JUNGEN WÜSTENRENNMÄUSEN

Um festzustellen ob es eine Entwicklung in der Verarbeitung von ITDs gibt, wurden ITD-Funktionen in erst 15 Tage alten Wüstenrennmäusen, 3 Tage nach Hörbeginn, gemessen. Die ITD-Funktionen von 15 Tage alten Wüstenrennmäusen unterschieden sich signifikant von denen erwachsener Tiere. Von den bei 14 Tieren abgeleiteten 18 Neuronen waren 7 monaural von jeweils nur einem Ohr erregbar und zeigten ITD-

Sensitivität. Die Bestfrequenzen dieser Zellen waren zwischen 400 Hz und 1800 Hz verteilt (Abbildung 79).

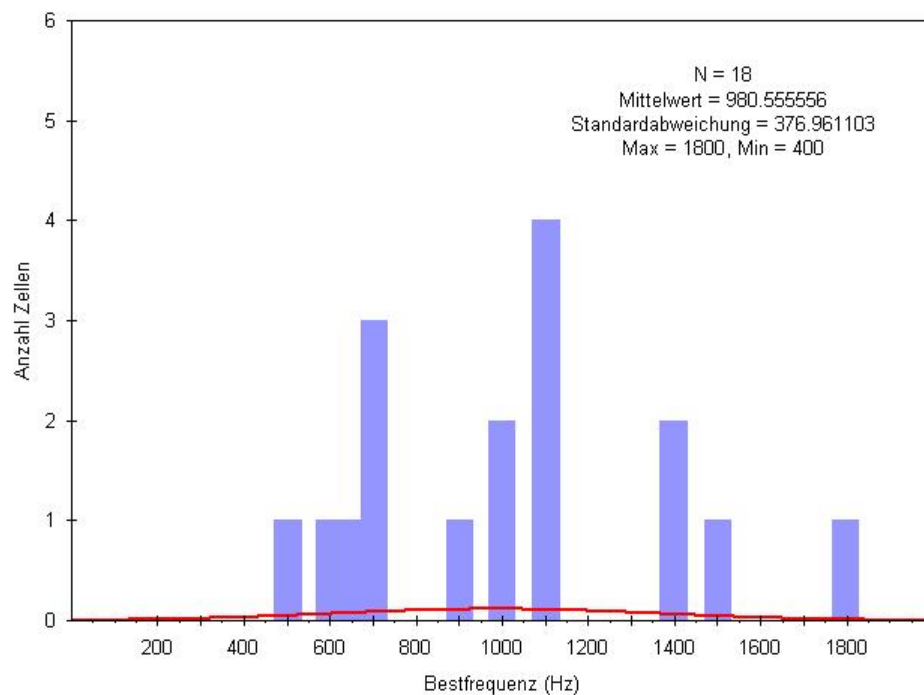


Abbildung 79 Bestfrequenzverteilung der bei jungen Tieren gemessenen ITD-Funktionen

Die BF der bei jungen Tieren gemessenen ITD-sensitiven Zellen lagen vor allem um 1000 Hz, aber auch bei 650 Hz. Binweite 50 Hz.

Ein repräsentatives Beispiel einer ITD-sensitiven Zelle eines jungen Tieres ist in Abbildung 80 zu sehen. Seine BF lag bei 900 Hz und die maximale Steigung an der BF bei $-104 \mu\text{s}$. Wie bei den Kontrolltieren ist hier bereits das zyklische Antwortverhalten erkennbar. Die Antwortraten in den jungen Tieren waren im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich geringer (vgl. Abbildung 75). Die mittlere beste IPD lag bei einem Wert um 0, die mittlere maximale Steigung dagegen lag klar außerhalb des physiologischen Bereiches (Tabelle 2 und Abbildung 81).

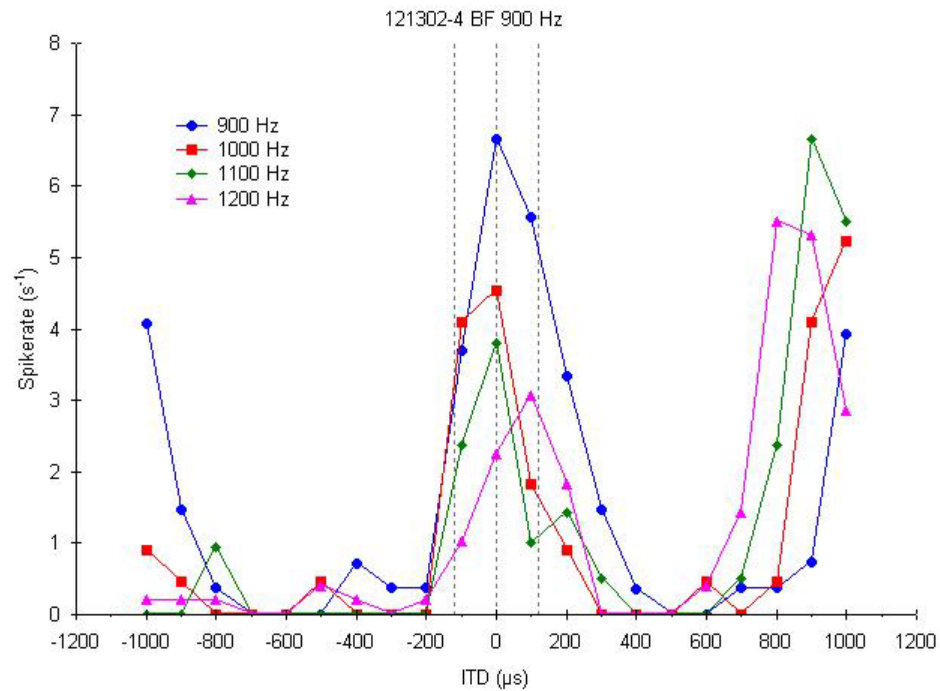


Abbildung 80 ITD-Funktion einer 15 Tage alten Wüstenrennmaus

ITD-Funktion einer Einzelzelle eines 15 Tage alten Tieres. Die beste ITD liegt nahe 0 (+53 μ s, oder +0,046 Zyklen) und die physiologische Modulationstiefe liegt bei nur 39 %. Die Bestfrequenz dieser Zelle liegt bei 900 Hz, und die maximale Steigung liegt bei -104 μ s. Die ITD-Funktion an der BF wurde durch 20 Wiederholungen ermittelt.

Interessanterweise waren die im DNLL bei jungen Tieren gemessene mittlere beste IPD der ITD-Funktionen statistisch nicht unterschiedlich von der mittleren besten IPD den ITD-Funktionen, die in der MSO bei pharmakologischer Blockade der Inhibition gefunden wurden (Brand et al., 2002) (DNLL junge Tiere siehe Tabelle 3, MSO 0,021 Zyklen, $\pm 0,054$; $P = 0,997$, Anova single factor Test).

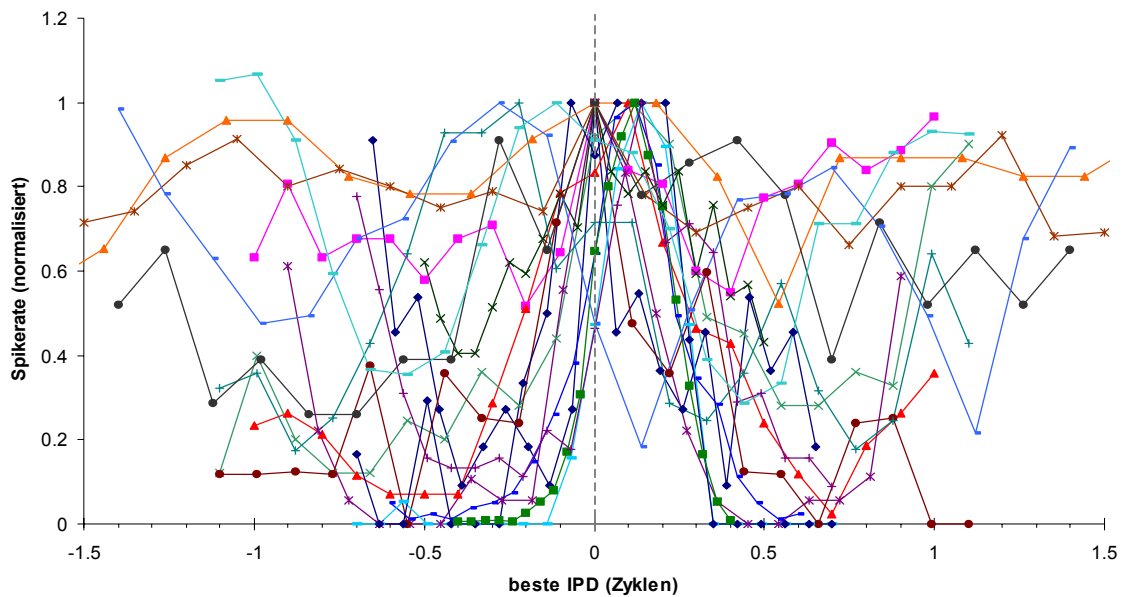


Abbildung 81 IPD-Funktionen von allen Zellen von juvenilen Tieren

IPD-Funktionen an der Bestfrequenz von allen Neuronen, die in 15 Tage alten Wüstenrennmäusen abgeleitet wurden. Die mittlere beste IPD liegt bei +0,023 Zyklen, und die maximale Steigung liegt im Schnitt bei $-220 \mu\text{s}$.

Als weiterer Parameter wurde bei den DNLL-Neuronen die Reizschwellen gemessen. Die Reizschwellen der Neurone lagen um mehr als 20 dB, damit also deutlich und statistisch signifikant über denen der adulten Kontrolltiere (Abbildung 83).

Die maximalen Steigungen der 15 Tage alten Tiere waren nicht wie bei den normal adulten Tieren auf den physiologischen Bereich abgestimmt, sondern befanden sich zu einem großen Teil im Bereich von ITDs die kleiner waren als $-120 \mu\text{s}$.

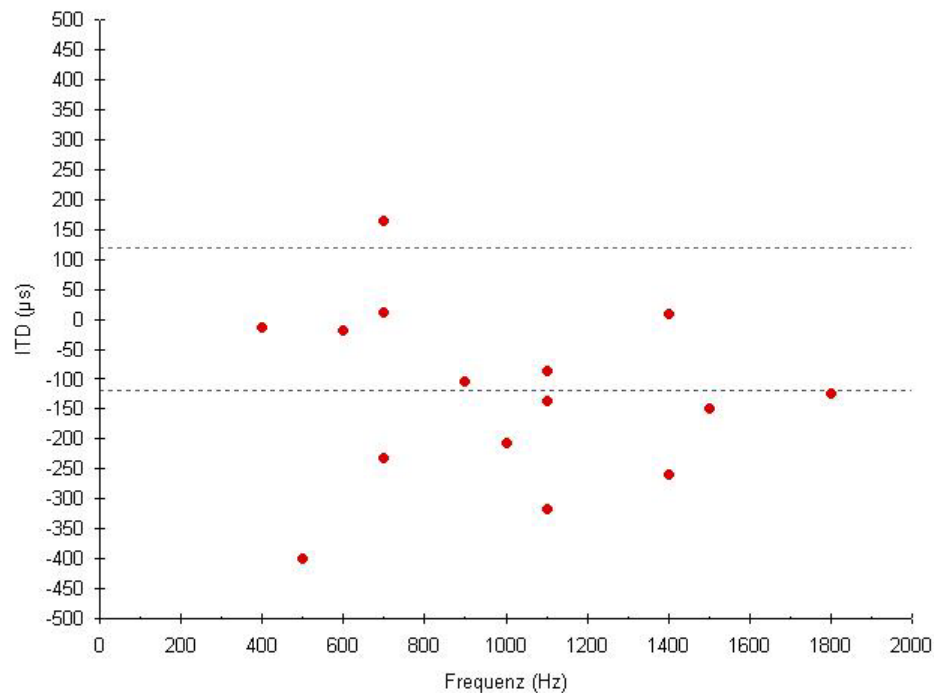


Abbildung 82 ITD der maximalen Steigung bei jungen Tieren

Die maximalen Steigungen der ITD-Funktionen im Verhältnis zur Bestfrequenz aufgetragen. Anders als bei den normalen adulten Tieren sind die maximalen Steigungen nicht hauptsächlich auf den physiologischen Bereich abgestimmt.

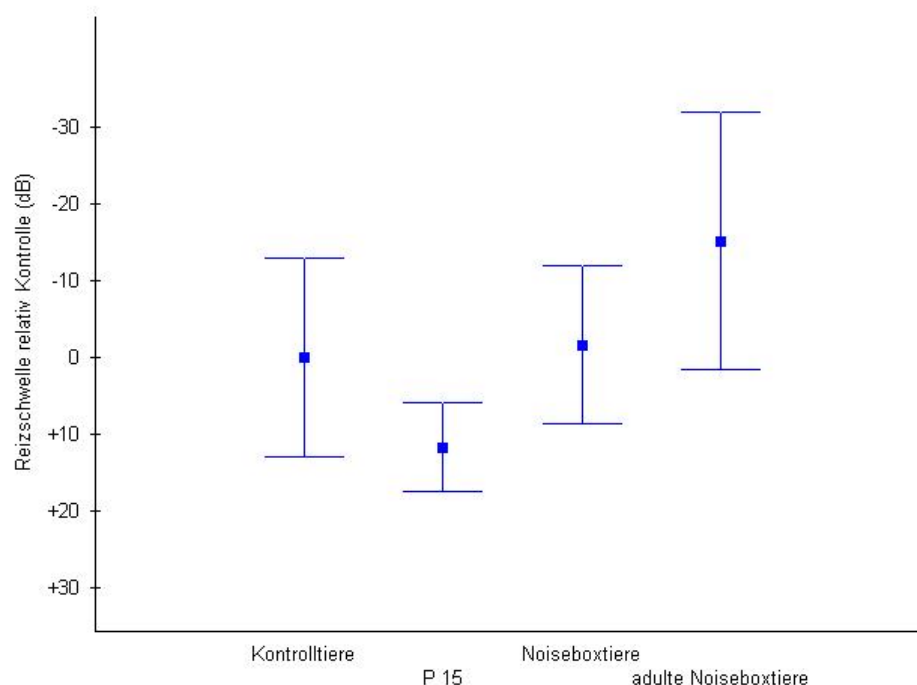


Abbildung 83 Reizschwellen der ITD-sensitiven Neurone im DNLL der verschiedenen Gruppen

Die mittleren Reizschwellen der Kontrolltiere und der in Rauschen aufgewachsenen Tieren sind nicht unterschiedlich. Bei den 14 und 15 Tage alten Tieren ist die Hörschwelle jedoch signifikant erhöht. Bei den Tieren die im adulten Stadium dem Rauschen ausgesetzt waren lag die Hörschwelle etwas niedriger als bei der Kontrollgruppe. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Bei Ableitungen an acht erst 14 Tage alten Tieren wurden unter 9 abgeleiteten Zellen keine ITD-sensitiven Zellen gefunden.

4.3.8 EINFLUSS DER FRÜHEN HÖRERFAHRUNG AUF DIE ENTWICKLUNG DER ITD-VERARBEITUNG

Die ITD-Sensitivität von DNLL-Neuronen in Wüstenrennmäusen, die in den ersten Tagen nach Hörbeginn, von P10 bis P15, in der Noisebox aufgezogen wurden, unterschied sich signifikant von der in Kontrolltieren gemessenen. Von den 62 bei unter Rauschexposition aufgewachsenen Wüstenrennmäusen gefundenen Zellen zeigten 22 eine sogenannte ‚peak-type‘ Aktivität. Der Mittelwert der BF dieser 22 Zellen lag bei 911 Hz, wobei die BF zwischen 200 und 1300 Hz variierte (Abbildung 84). Die Verteilung der BF dagegen war in der Kontrollgruppe und der im Rauschen aufgezogenen Gruppe nicht statistisch unterschiedlich (Anova single factor Test).

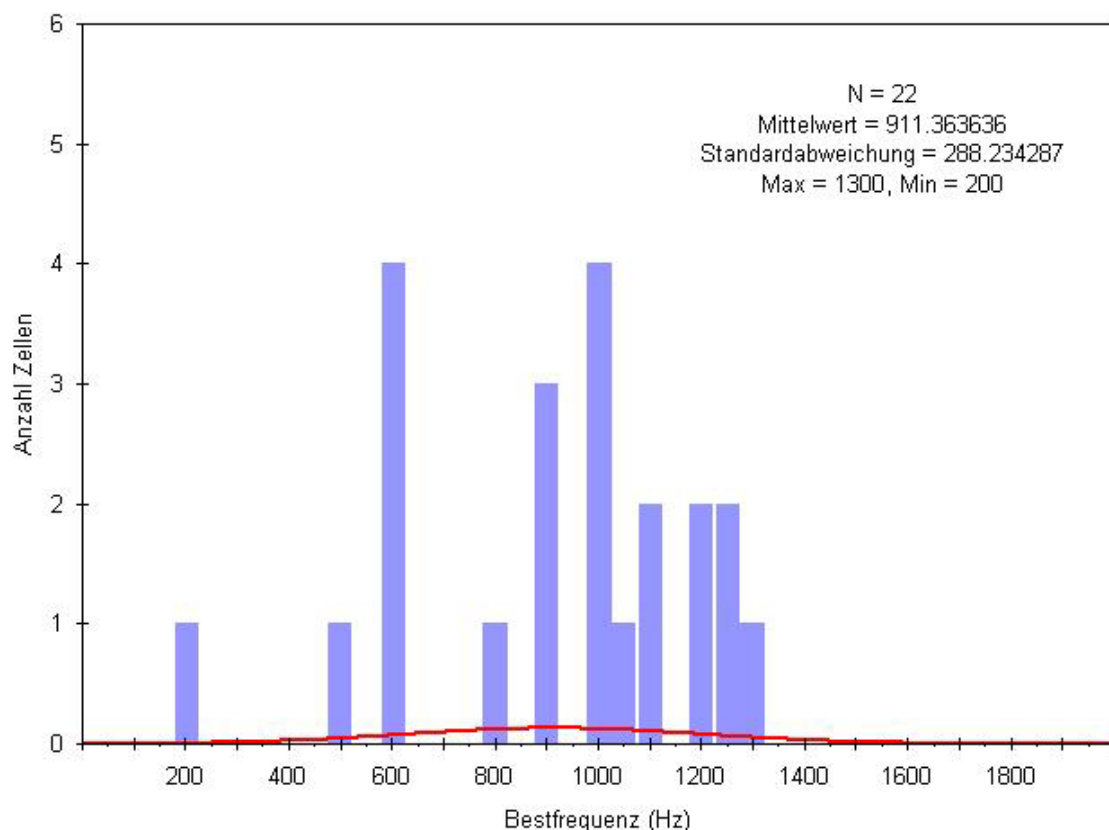


Abbildung 84 Bestfrequenzen der ITD-sensitiven Zellen der im Rauschen aufgewachsenen Tiere
Der Mittelwert der BF der ITD-sensitiven Zellen der im Rauschen aufgewachsenen Tiere liegt bei 911 Hz, und die Bandbreite schwankt, ähnlich wie bei der Kontrollgruppe, zwischen 200 und 1300 Hz.

Eine beispielhafte ITD-Funktion einer Zelle, die bei einem im Rauschen aufgezogenen Tier abgeleitet wurde, zeigt Abbildung 85. Die beste ITD an der BF lag bei $-52 \mu\text{s}$ und die maximale Steigung bei $-276 \mu\text{s}$. Die entsprechende beste IPD ($-0,063$ Zyklen) lag somit weit entfernt vom Mittelwert der besten IPDs der Kontrolltiere, und die maximale Steigung lag außerhalb des physiologischen Bereiches. Die ‚peak-type‘ Eigenschaft dieser Zelle wird deutlich. Zwischen 1100 und 1400 Hz hatten die besten ITDs ähnliche Werte.

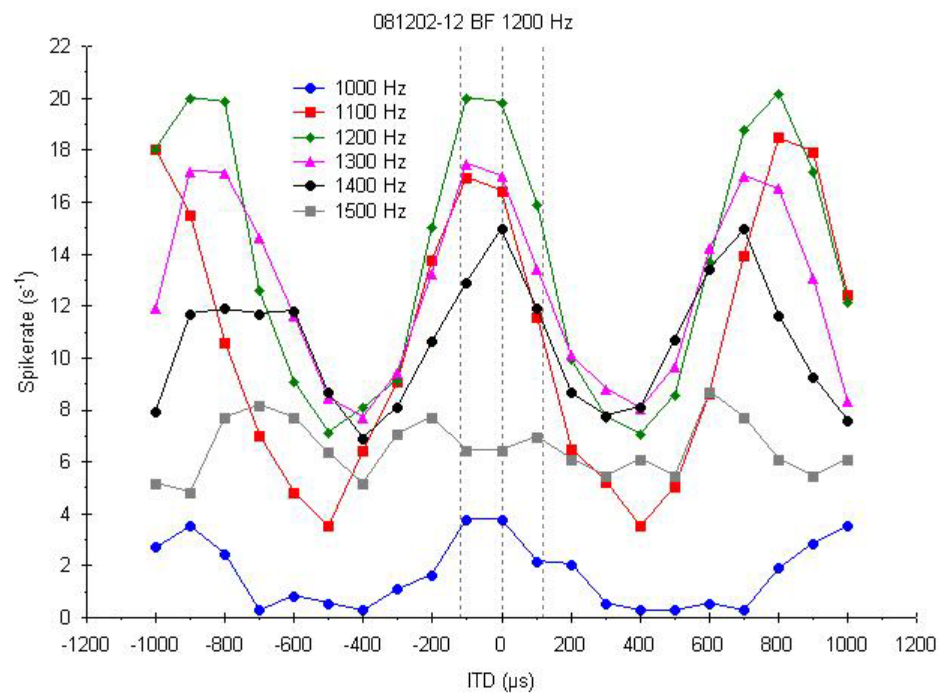


Abbildung 85 ITD-Funktion einer Noisebox-Wüstenrennmaus

Beispiel einer ITD-Funktion einer Zelle, die von einem im Rauschen aufgewachsenen Tier aufgenommen wurde. Die beste ITD an der Bestfrequenz (1200 Hz) liegt nahe 0 ($-53 \mu\text{s}$, entsprechend $-0,063$ Zyklen). Die ITD-Sensitivität ist unabhängig von der Frequenz (‚peak-type‘), und die physiologische Modulationstiefe an der BF beträgt nur 23 %. Die ITD-Kurve an der BF wurde mit 59-61 Wiederholungen pro Stimulus ermittelt.

Eine grafische Darstellung aller 22 bei der Bestfrequenz aufgenommenen ITD-Funktionen in Abbildung 86 illustriert, dass die meisten Neurone von in Rauschen aufgezogenen Tieren eine andere ITD-Sensitivität zeigten als in Kontrolltieren.

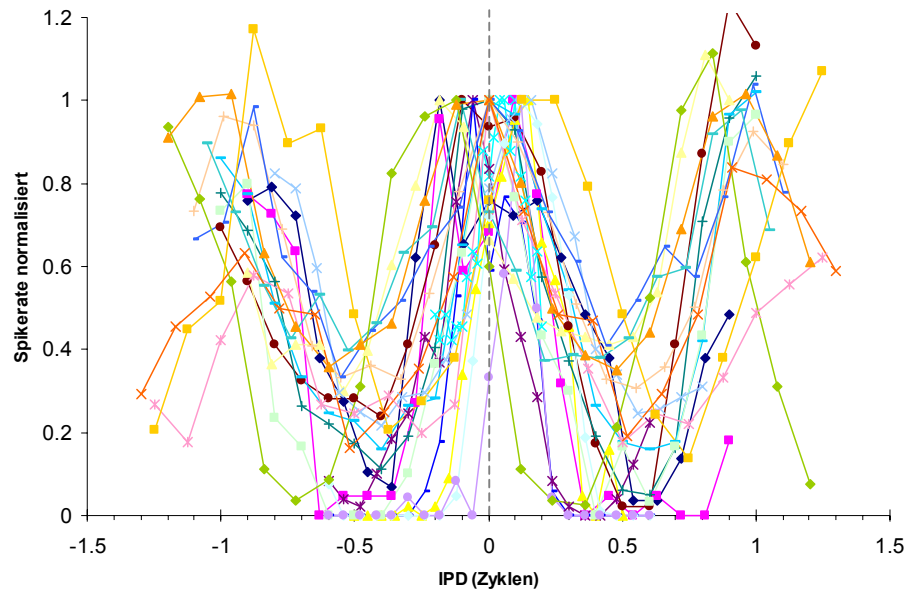


Abbildung 86 Verteilung aller ITD-sensitiven Zellen von Noisebox-Tieren

IPD-Funktionen aller DNLL-Neurone, die von im Rauschen aufgezogenen Wüstenrennmäusen abgeleitet werden. Die besten IPDs sind um 0 verteilt und die maximalen Steigungen sind nicht systematisch auf eine IPD um 0 abgestimmt. Einige ITD-Funktionen haben ihre beste IPD im negativen Bereich.

Über die gesamte Population war die mittlere beste IPD deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe ($P < 0,0005$; Tabelle 3 und Abbildung 88), und die mittlere maximale Steigung war außerhalb des Bereiches der physiologischen ITDs. 82% aller ITD-Funktionen der Kontrollgruppe hatten ihre maximale Steigung innerhalb des physiologischen Bereiches, aber nur 45% der ITD-Funktionen der berauschten Tiere (bei den Kontrolltieren war das immer der ‚linke‘ Flügel, bei den berauschten Tieren wurde immer die Flanke der ITD-Funktion berücksichtigt, die der 0-ITD-Achse am nächsten war). Die maximalen Steigungen der ITD-Kurven von im Rauschen aufgezogenen Tieren sind nicht systematisch auf den physiologischen Bereich abgestimmt (Abbildung 87). Mehr als die Hälfte der maximalen Steigungen liegen außerhalb des Bereiches der physiologischen ITDs.

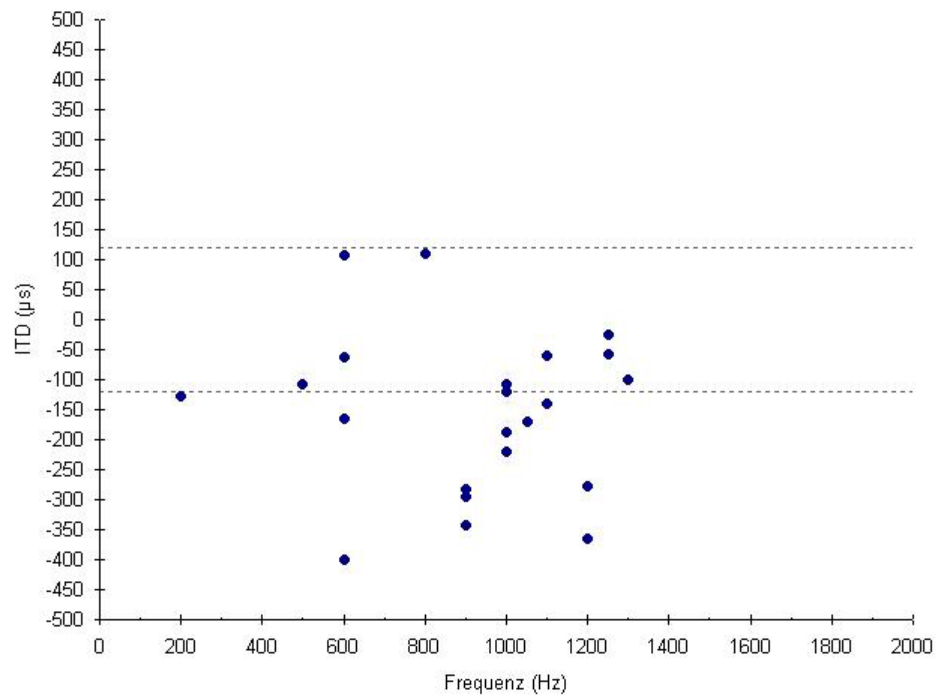


Abbildung 87 Verteilung der maximalen Steigungen bei Noisebox Tieren

Verteilung der maximalen Steigungen an der BF von ITD-Funktionen von Zellen die im DNLL von im Rauschen aufgewachsenen Wüstenrennmäusen gefunden wurden, sind gegen die BF aufgetragen. Mehr als die Hälfte der maximalen Steigungen liegen außerhalb des Bereichs der physiologischen ITDs der Wüstenrennmaus (grau gestrichelte Linien).

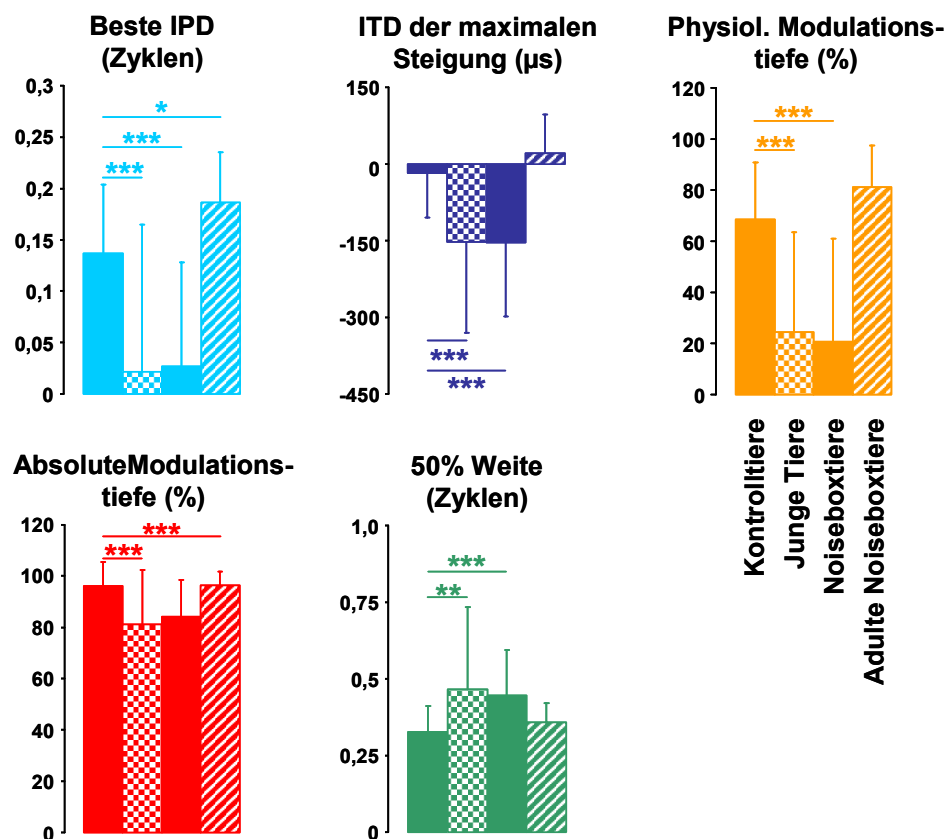


Abbildung 88 (vorherige Seite) Quantifizierung der ITD/IPD-Funktionen an der BF jedes Neurons

Für alle Parameter außer der 50% Weite sind die Kontrolltiere signifikant unterschiedlich von den im Rauschen aufgezogenen Tieren. Die Parameter der jungen Tiere sind denen der Noiseboxtiere sehr ähnlich. Sternchen kennzeichnen statistische Unterschiede (** $P < 0,0005$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Bemerkenswerterweise war der Wert für die mittlere beste IPD der in der Noisebox aufgewachsenen Tiere, wie der bei jungen Tieren, nicht signifikant unterschiedlich von dem Wert, der in der MSO während Blockade von glyzinerger Inhibition gemessen wurde (0,021 Zyklen, $\pm 0,054$; $P = 0,912$, Anova single factor Test). Dementsprechend war auch die Modulationstiefe über den physiologischen Bereich im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant reduziert ($P < 0,0001$; siehe Tabelle 3 und Abbildung 88). Dieser Wert war wiederum vergleichbar mit MSO-Werten während der Blockade der Hemmung (20,5%; $\pm 4,37$; $P = 0,984$, Anova single factor Test) (Brand et al., 2002) und mit den Daten, die bei jungen Tieren gefunden wurden. Die mittlere absolute Modulationstiefe der ITD-Funktionen bei im Rauschen aufgezogenen Tieren war ebenfalls geringer als bei Kontrollbedingungen ($P < 0,001$; Tabelle 3 und Abbildung 88), aber ebenfalls vergleichbar den Werten von Jungtieren (Abbildung 88) und den Werten von MSO-Neuronen, bei denen die Hemmung blockiert war (82,4%, $\pm 12,90$) (Brand et al., 2002). Die absolute Modulationstiefe lag trotz des Unterschiedes zur Kontrollgruppe immer noch über 80% (Tabelle 3), ein Hinweis darauf, dass der Koinzidenzmechanismus der MSO intakt war. Die 50%-Breiten der ITD-Funktionen der Rauschgruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht, aber statistisch nicht signifikant erhöht. Der Mittelwert war wiederum vergleichbar mit dem der Jungtiere (Tabelle 3 und Abbildung 88).

Tiergruppe	ITD-sensitive Zellen (Zellen gesamt, Tiere)	Absolute Modulations -tiefe	Physiol. Modulations -tiefe	Beste IPD (Zyklen)	Maximale Steigung (μ s)	50% Breite (Zyklen)
Kontrolle	39 (65; 11)	96,25% \pm 9,24	68,44% \pm 22,27	0,137 \pm 0,067	-17,72 \pm 87,60	0,33 \pm 0,08
Berauschte Tiere	22 (62; 8)	84,0% \pm 14,46	20,82% \pm 40,10	0,027 \pm 0,101	-152,96 \pm 145,01	0,45 \pm 0,15
Berauschte erwachsene Tiere	13 (26; 4)	96,27% \pm 5,50	81,10% \pm 16,14	0,186 \pm 0,049	21,29 \pm 75,83	0,36 \pm 0,062
Jungtiere	18 (30; 14)	80,99% \pm 21,38	24,51 \pm 39,05	0,022 \pm 0,143	-151,77 \pm 178,44	0,46 \pm 0,27

Tabelle 3 Alle untersuchten Parameter der verschiedenen Tiergruppen

Für alle ITD-Funktionen von den vier untersuchten Tiergruppen wurden die mittleren Werte für die Parameter absolute und physiologische Modulationstiefe, beste IPD, maximale Steigung und 50% Breite berechnet.

Es kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass ein Teil der untersuchten Neurone bei in der Noisebox aufgezogenen Tieren einen Eingang von der contralateralen MSO bekommen hat, also spiegelbildlich abgestimmt war. Eine solche Projektion wurde zwar bislang für den DNLL noch nicht gefunden (Schwartz, 1992), aber Neurone mit dieser Eigenschaft wurden im IC beschrieben (McAlpine et al., 2001). Obwohl im Rahmen dieser Arbeit bei normal aufgewachsenen Tieren keine solchen Neurone gefunden wurden, sollte man ausschließen, dass der gefundene Unterschied zwischen der Kontroll- und im Rauschen aufgewachsenen Gruppe auf einer Überrepräsentation umgekehrter ITD-Funktionen basiert. Dazu wurden alle ITD-Funktionen der in der Rauschbox aufgezogenen Gruppe, die bei negativen ITDs ihr Maximum hatten, an der Y-Achse gespiegelt und die Werte für beste IPD und maximale Steigung neu berechnet. Trotzdem unterschied sich die beste IPD und maximale Steigung von Kontrolltieren und von im Rauschen aufgezogenen Tieren signifikant (beste IPD: 0,080 Zyklen; \pm 0,07, $P < 0,005$; maximale Steigung: -75,78 μ s; \pm 134,98; $P < 0,05$; Anova single factor Test).

Etwaige Schädigungen in der Funktionalität des Hörsystems, vor allem in der Peripherie, würden sich unter anderem in unterschiedlichen Hörschwellen zeigen. Aus diesem Grund wurden die Hörschwellen an der Bestfrequenz der beiden Gruppen verglichen. Bei den Kontrolltieren lag die mittlere Schwelle bei 55,64 dB ($\pm 13,53$) Abschwächung, bei den berauschten Tieren bei 57,27 dB ($\pm 10,77$). Beide Verteilungen waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich (t -test).

4.3.9 EINFLUSS DES BERAUSCHENS AUF ITD-SENSITIVITÄT BEI ADULTEN TIEREN

Um auszuschließen, dass die gefundenen Unterschiede der ITD-Funktionen von Kontroll- und Noiseboxtieren ein Nebeneffekt der Rauschexposition war, wurde getestet, ob weißes Rauschen auch die ITD-Sensitivität in adulten Wüstenrennmäusen beeinflusst. Aus diesem Grund setzten wir adulte Wüstenrennmäuse für den gleichen Zeitraum unter gleichen Bedingungen dem omnidirektionalen weißen Rauschen aus. Nach einer Mindesterholzeit von 10 Tagen nach Rauschexposition erfassten wir Daten von 26 Neuronen, von denen 13 eine ‚peak-type‘ ITD-Sensitivität zeigten. Die Verteilung der Bestfrequenzen variierte von 500 Hz bis 1225 Hz.

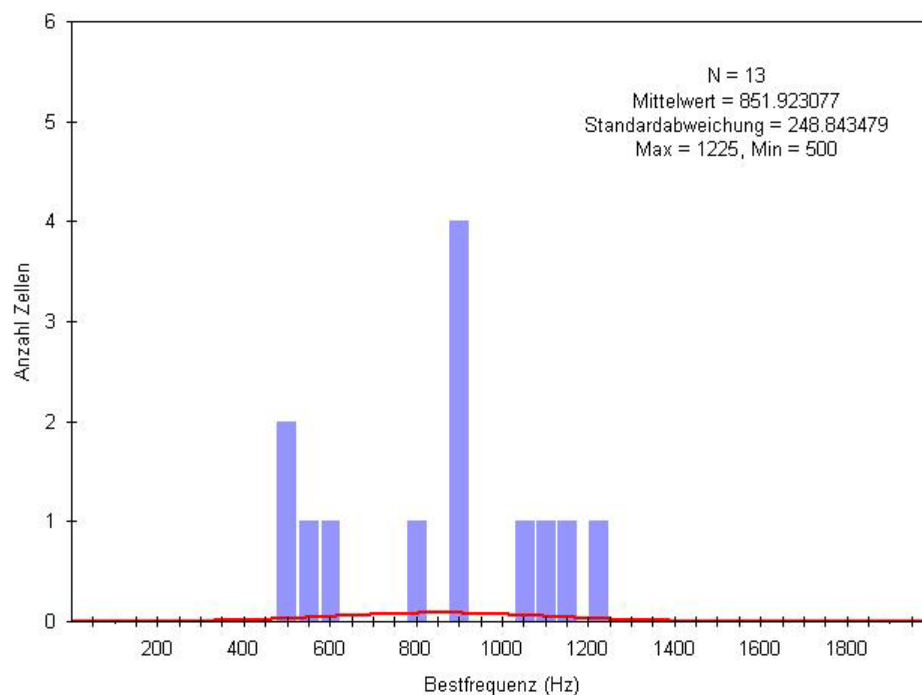


Abbildung 89 Verteilung der Bestfrequenzen der Zellen der adult berauschten Gruppe
Die BF variierten von 500 Hz bis 1225 Hz um einen Mittelwert von 851 Hz.

Ein typisches Beispiel einer ITD-sensitiven Zelle eines im bereits adulten Stadium dem Rauschen ausgesetzten Tieres ist in Abbildung 90 zu sehen. Die beste IPD dieser Zelle an der BF lag bei 0,197 Zyklen (188 μ s) und die maximale Steigung bei +43 μ s. Die Zelle hatte ‚peak-type‘ Eigenschaften, und die maximale Steigung lag im Bereich der physiologisch relevanten ITDs.

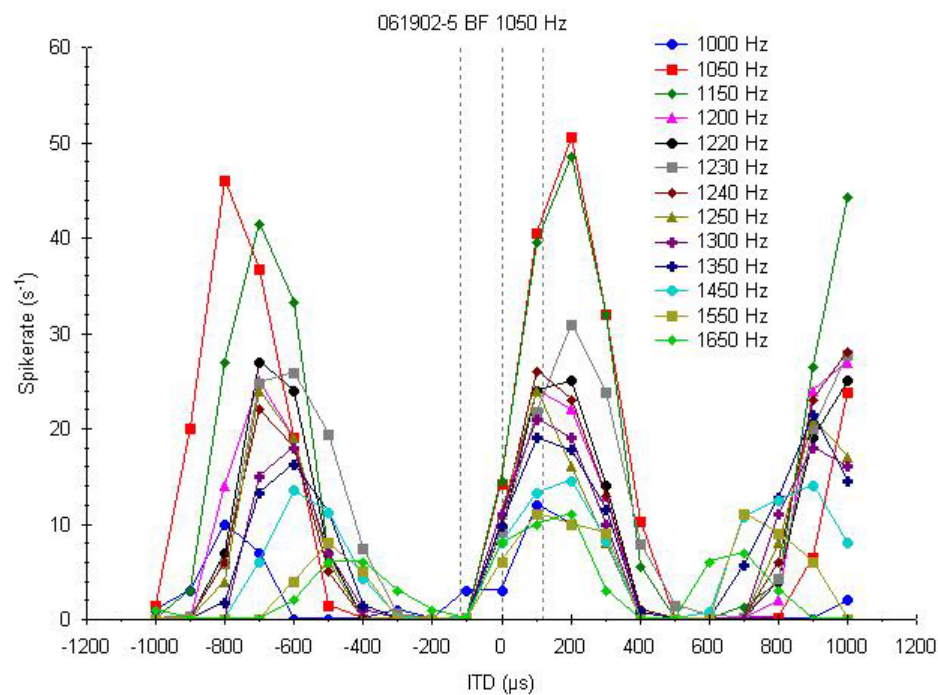


Abbildung 90 ITD-Funktion einer Zelle eines adult berauschten Tieres

Ableitung eines DNLL-Neurons von einem Tier, das im Erwachsenenalter weißem Rauschen ausgesetzt war. Die Bestfrequenz dieser Zelle lag bei 1050 Hz. Die ITD-Funktionen sind unabhängig von der Stimulationsfrequenz (‚peak-type‘) und die maximalen Steigungen sind nahe 0 ITD (+43 μ s). Die beste IPD an der BF dieser Zelle lag jedoch etwas höher als bei einer durchschnittlichen ITD-Funktion eines Kontrolltieres, nämlich bei 188 μ s (0,197 Zyklen bei 1050 Hz). Die ITD-Funktion an der BF wurde durch 40 Stimuluswiederholungen ermittelt.

Die Daten für Modulationstiefen, maximale Steigung und 50 %-Breite waren nicht unterschiedlich von Daten der Kontrollgruppe. Die mittlere beste IPD dagegen war leicht, aber signifikant unterschiedlich (Tabelle 3 und Abbildung 88). Während die mittlere beste IPD bei den berauschten Tieren jedoch nahe 0 IPD lag, war der Wert bei den adult dem Rauschen ausgesetzten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht.

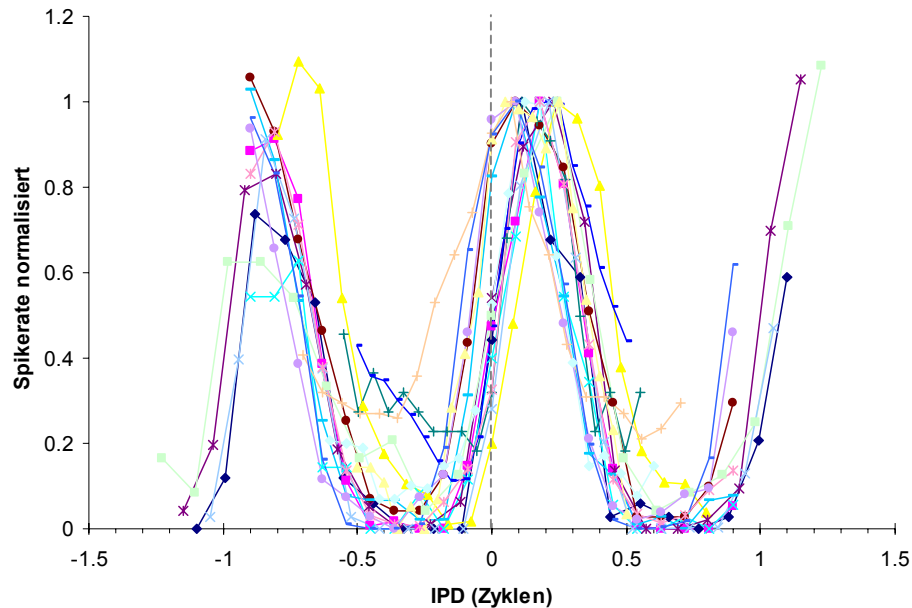


Abbildung 91 IPD-Funktionen von adult berauschten Tieren

Alle IPD-Funktionen von adulten Tieren, die dem Rauschen in der Noisebox ausgesetzt waren. Die maximalen Steigungen aller Kurven sind auf 0 IPD abgestimmt.

Die Reizschwellen der adult berauschten Tiere lag bei mittleren 70,77 dB ($\pm 17,54$) Abschwächung. Dieser Wert ist zwar nur leicht niedriger als der Wert der Kontroll- und berauschten Tiere, aber trotzdem statistisch unterschiedlich (t -test).

Um auszuschließen, dass die statistisch signifikante Erhöhung der mittleren besten IPD der im Erwachsenenstadium in der Noisebox gehaltenen Tiere nicht durch unsere Berechnungsmethode (Vektorkalkulation nach Goldberg und Brown Goldberg and Brown, 1969) zustande kam, wurden an die bis dato vorhandene Auswahl an ITD-Funktionen der verschiedenen Gruppen (Kontrolle, berauscht, erwachsen berauscht) Gauß-Funktionen angepasst und deren mittlere Maxima miteinander verglichen (Abbildung 92).

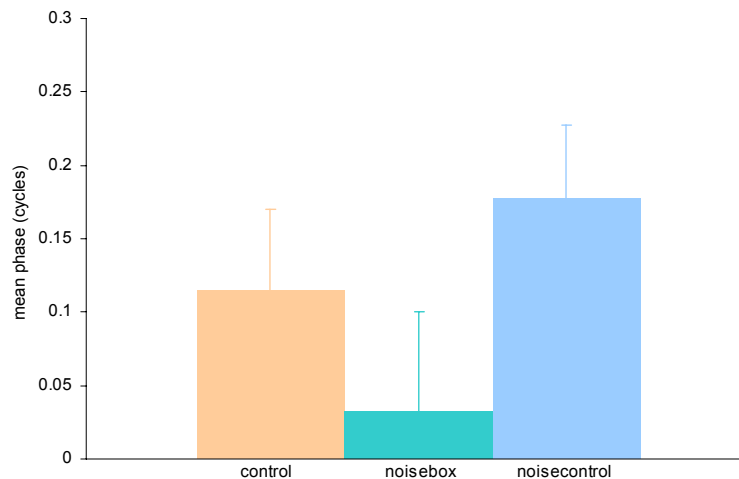


Abbildung 92 Beste IPD der verschiedenen Gruppen mittels Gaußscher Anpassungskurven

Die Verhältnisse der besten IPDs der drei untersuchten Gruppen verhalten sich bei der Bestimmung der besten IPD mittels Gaußkurven vergleichbar wie bei Bestimmung der besten IPD mit der Vektorkalkulation nach Goldberg und Brown. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Es wurden 28 Zellen von Kontrolltieren, 13 von im Rauschen aufgezogenen Tieren und 13 von adult dem Rauschen exponierten Tieren untersucht. Die Werte beider Methoden der Bestimmung der besten IPD sind jeweils vergleichbar (Tabelle 4).

Beste IPD in Zyklen	Vektorkalkulation nach Goldberg und Brown	Gaußkurven
Kontrolltiere	0,119 ±0,0588	0,114 ±0,0554
NRA Tiere	0,0302 ±0,0762	0,0327 ±0,068
Adult berauschte Tiere	0,186 ±0,0491	0,177 ±0,050

Tabelle 4 Vergleich der besten IPD für beide Ermittlungsarten

Die Werte der mittleren besten IPDs für alle drei untersuchten Gruppen verhalten sich für beide angewandten Berechnungsmethoden sehr ähnlich.

Folglich ist anzunehmen, dass es sich bei der Erhöhung der besten IPD bei rausch-exponierten erwachsenen Tieren um einen tatsächlichen Effekt handelt. Ungeklärt ist

allerdings, ob dieser Effekt konsistent ist oder nur für eine bestimmte Zeitspanne nach der Berausung anhält (siehe dazu 4.3.10).

4.3.10 ADULTE PLASTIZITÄT DER ITD-SENSITIVITÄT

Die mittlere beste IPD der adult dem Rauschen ausgesetzten Gruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch unterschiedlich (siehe Abbildung 88). Der Wert war jedoch im Gegensatz zu den im Rauschen aufgezogenen Tieren nicht kleiner als der Kontrollwert, sondern höher (Abbildung 88). Alle anderen gemessenen Parameter der adult dem Rauschen exponierten Gruppe waren nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Es wurden vier adulte Tiere in der Noisebox gehalten. Vier der Tiere waren zum Zeitpunkt des Experimentes 65 bis 73 Tage alt und wurden 11 bis 26 Tage nach dem Aufenthalt in der Noisebox untersucht.

Ein Tier wurde erst 137 Tage (~ 4,5 Monate) nach dem Rauschen in das Experiment genommen, wobei von 4 ITD-sensitiven Zellen abgeleitet wurde. Die mittlere beste IPD dieser Zellen, 137 Tage nach dem Berauschen, war deutlich niedriger als die der Zellen, die 11 bis 26 Tage nach dem Noiseboxexperiment abgeleitet wurden (Abbildung 93) und der Zellen der Kontrollgruppe. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Diese vorläufigen Daten weisen auf eine nicht permanente Veränderung der ITD-Sensitivität hin. Dieses Ergebnis wurde inzwischen im Rahmen einer Diplomarbeit bestätigt (Kollmar, 2003).

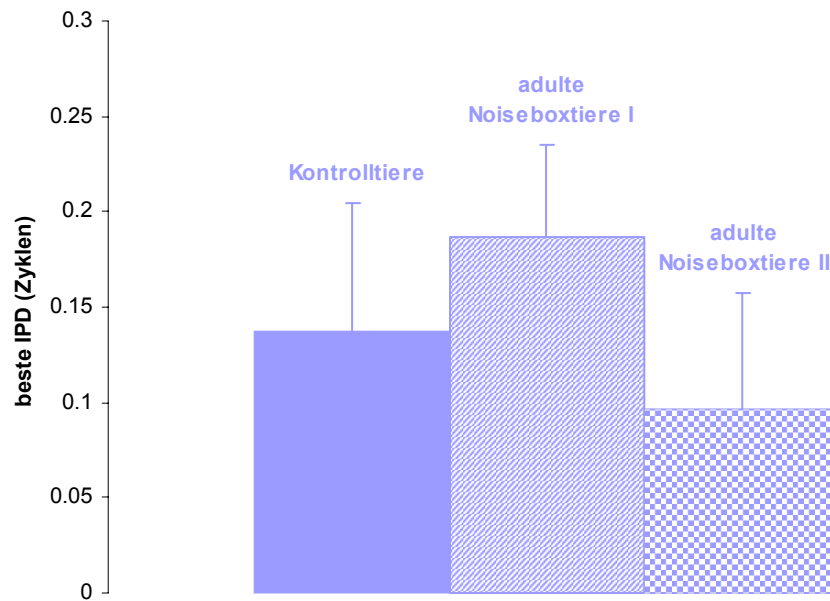


Abbildung 93 Mittlere beste IPDs von Kontroll- und adult dem Rauschen ausgesetzten Tieren

In einer Zeitspanne von 11 bis 26 Tagen nach Verlassen der Noisebox ist die beste IPD signifikant erhöht. Nach einer Zeitspanne von insgesamt 137 Tagen ist die beste IPD deutlich geringer. Fehlerbalken: Standardabweichung.

5 DISKUSSION

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Entwicklung der Verteilung der glyzinerger Synapsen an MSO-Neuronen in Wüstenrennmäusen abhängig ist von der Erfahrung räumlicher akustischer Signale. Wurden diese Signale durch omnidirektionales weißes Rauschen während einer kritischen Periode kurz nach Hörbeginn maskiert, so wurde die Beschränkung der inhibitorischen Eingänge auf das Soma im Laufe der Entwicklung teilweise unterdrückt. Weitere Ergebnisse demonstrierten, dass es an den MSO-Zellen der Ratte, einem Tier das ITDs wohl nicht primär zur Schalllokalisation verwendet, nicht zu einer solchen Beschränkung während der Entwicklung kommt. Die Begrenzung der inhibitorischen Synapsen auf das Zellsoma scheint daher eine Spezialisierung für die ITD-Kodierung in der MSO darzustellen. Die Restriktion der inhibitorischen Synapsen auf das Soma könnte die zeitliche Summation der Inhibition minimieren und damit die Fähigkeit, solche ITDs im Mikrosekundenbereich zu verarbeiten, erheblich verbessern.

Die Fragestellung für den zweiten Teil der Arbeit folgte direkt aus den Ergebnissen des ersten Teils. Wie sich bei den immunohistochemischen Versuchen zeigte, hat die Verteilung der inhibitorischen Eingänge einen Einfluss auf die ITD-Kodierung. Darüber hinaus lassen vorläufige Ergebnisse aus unserem Labor von *in vitro* Ableitungen in der MSO der Wüstenrennmaus vermuten, dass sich die zeitliche Präzision der Übertragung der Inhibition nach Hörbeginn verändert (Kapfer, 2003), also direkt mit der Verteilung der glyzinerger Synapsen an einzelnen Zellen korreliert. Da die Beschränkung der glyzinerger Synapsen auf das Zellsoma von MSO-Neuronen nur bei ITD-verarbeitenden Tieren auftritt, ist zu erwarten, dass sie ein strukturelles Korrelat für die ITD-Kodierung darstellt. Einzelzellableitungen im DNLL zeigten eine Entwicklung in der ITD-Abstimmung bei der Wüstenrennmaus nach Hörbeginn. Außerdem wurde gezeigt, dass die ITD-Eigenschaften des DNLL, denen ihres Ursprungs, nämlich den Zellen in der MSO, sehr ähnlich sind. ITD-Funktionen in jungen Tieren kurz nach Hörbeginn zeigten beste ITDs um 0 ITD, wohingegen in adulten Tieren die mittlere beste IPD deutlich in die contralaterale Hörhemisphäre verschoben war. Diese Verschiebung bewirkte, dass die maximale Steigung der ITD-Funktion innerhalb des physiologischen Bereiches nahe 0 ITD liegt. In Tieren, die kurz nach Hörbeginn omnidirektionalem Rauschen ausgesetzt waren, gab es diese

Verschiebung nicht, sie zeigten eine Verteilung der besten ITDs um 0 ITD, also ähnlich dem Muster der ITD-Funktionen von jungen Tieren. Ein oder mehrere wichtige Schritte in der Entwicklung der ITD-Kodierung konnten demnach durch Aufzucht in Rauschen blockiert werden. Interessanterweise glichen ITD-Funktionen des DNLL von jungen und im Rauschen aufgewachsenen Tieren denen in der MSO während Blockade der Inhibition (Brand et al., 2002). Wurden erwachsene Tiere dem weißen Rauschen ausgesetzt, so kam es zwar zu einer Verschiebung der ITD-Funktionen hin zu höheren besten ITDs, dieser Effekt entsprach aber nicht der Wirkung des weißen Rauschen bei Tieren kurz nach Hörbeginn. Daraus folgt also, dass es nach Hörbeginn eine kritische Periode für die Entwicklung der ITD-Sensitivität gibt.

Obwohl wir Änderungen in der Entwicklung der erregenden Eingänge zur MSO nicht ausschließen können, gab es doch eine direkte Korrelation zwischen der Entwicklung der ITD-Funktionen und der Entwicklung von inhibitorischen Synapsen auf MSO-Zellsomata, die darauf hinwiesen, dass die Verteilung der hemmenden Eingänge auf MSO-Zellen einen direkten Einfluss auf die ITD-Sensitivität hat.

5.1 ERFAHRUNGSABHÄNGIGE ENTWICKLUNG DER VERTEILUNG GLYZINERGER SYNAPSEN AN NEURONEN DER MEDIALEN OBEREN OLIVE

Frühere Ergebnisse haben gezeigt, dass die inhibitorischen Eingänge zu MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus auf das Zellsoma beschränkt sind (Seidl, 1999; Kapfer et al., 2002). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Verteilung von flachen Vesikeln in präsynaptischen Terminalen an der MSO von Katzen (Clark, 1969) und Chinchillas (Perkins, 1973): Diese flachen Vesikel werden inhibitorischen Synapsen zugeordnet. Alle genannten Tierarten besitzen ausgeprägtes Hörvermögen im tieffrequenten Bereich und ihre MSO-Neurone sind für eine hohe Auflösung von interauralen Zeitdifferenzen spezialisiert (Langford, 1984; Yin and Chan, 1990; Spitzer and Semple, 1995; Grothe, 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass in der Ratte, einem Tier, das nicht auf das Hören von tiefen Frequenzen spezialisiert ist (Kelly and Masterton, 1977) und wahrscheinlich auch keine ITDs zur Schalllokalisation benutzt (Inbody and Feng, 1981), die glyzinergeren Synapsen nicht auf das Soma beschränkt waren. Eine Beschränkung der inhibitorischen Eingänge zur MSO

auf das Soma könnte somit eine Anpassung an die ITD-Verarbeitung im Submillisekundenbereich darstellen. Clark spekulierte aufgrund eigener physiologischer Ergebnisse schon 1969 (Clark and Dunlop, 1969) über die funktionelle Bedeutung der Beschränkung inhibitorischer Eingänge. Clark postulierte, dass die präsynaptische Hemmung durch die Reduzierung der Anzahl an Eingängen ihre Effektivität steigern und das zeitliche Auflösungsvermögen von MSO-Neuronen verbessern könnte (Clark, 1969). Durch Verringerung der zeitlichen Summation der inhibitorischen Eingänge könnte die Kinetik der Hemmung gesteigert werden. Die räumliche Anordnung von erregenden Synapsen spielt tatsächlich bei der zeitlichen Verarbeitung von Signalen eine wichtige Rolle (Agmon-snir et al., 1998). Daher scheint es möglich, dass die Kompartimentalisierung von hemmenden Projektionen ebenso für die zeitliche Genauigkeit des Eingangs bedeutend ist. Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen an der MSO, bei denen die glyzinerge Transmission pharmakologisch blockiert wurde, zeigten, dass sich der Zeitpunkt und die Dauer der Hemmung auf die Zeitverarbeitung von einzelnen MSO-Neuronen auswirkt (Grothe and Sanes, 1994). Ein Modell zur Wirkungsweise der Inhibition auf die Informationsverarbeitung in MSO-Neuronen wurde erstmals von Batra et al. vorgeschlagen (Batra et al., 1997a), und Grothe und Park postulierten etwas später konkret, dass eine Inhibition, die zeitgleich mit der Erregung einsetzt, funktionelle Verzögerungsketten schaffen könnte (Grothe and Park, 1998). Der direkte Nachweis für eine Rolle der Inhibition wurde jedoch erst vor kurzem erbracht: Brand et al. demonstrierten mit pharmakologischer Blockade der Inhibition *in vivo* an MSO-Neuronen den Einfluss der Hemmung auf die Verarbeitung von ITDs (Brand et al., 2002).

An MSO-Neuronen der Ratte war die Verteilung der glyzinerger Synapsen an MSO-Neuronen vor Hörbeginn vergleichbar mit der Wüstenrennmaus zwei Tage vor Hörbeginn. Die inhibitorischen Eingänge waren über Somata und Dendriten gleichmäßig verteilt (Seidl, 1999; Kapfer et al., 2002). Während die hemmenden Eingänge bei der Wüstenrennmaus nach Einsetzen der Höraktivität jedoch eine Restriktion auf das Soma erfuhren (Seidl, 1999; Kapfer et al., 2002), änderte sich die Verteilung bei der Ratte im Laufe der Entwicklung nach Hörbeginn nicht. Die entwicklungsabhängige Veränderung in der Wüstenrennmaus war abhängig von akustischer Erfahrung kurz nach Hörbeginn. Wurde diese durch omnidirektionales weißes Rauschen zu einem bestimmten Grad unterdrückt, so konnte die normale Entwicklung der Verteilung nicht mehr ablaufen. Daten von zwei adulten

Wüstenrennmäusen, die im Erwachsenenalter dem omnidirektionalen Rauschen exponiert waren, zeigten, dass die veränderte akustische Erfahrung keinerlei Auswirkungen im Erwachsenenstadium hat. Ein Zeitfenster von maximal 13 Tagen nach Hörbeginn ist also notwendig, um bestimmte Hörerfahrung zu machen. Diese Aussage wird gestützt durch unilaterale Cochleaentfernungen bei erwachsenen Wüstenrennmäusen, die ebenfalls zu keiner Veränderung in der Verteilung der glyzinerger Synapsen an MSO-Neuronen geführt hat (Kapfer, 1999; Kapfer et al., 2002).

Das Maskieren von räumlicher akustischer Erfahrung (vorliegende Arbeit) und das Entfernen einer Cochlea (Kapfer, 1999) führten zu einer Erhöhung der Glyzinrezeptordichte auf den Dendriten von MSO-Neuronen bei der Wüstenrennmaus. Diese beiden Ergebnisse legen nahe, dass spezifische, aufeinander abgestimmte binaurale Aktivität für die räumliche Beschränkung der hemmenden Synapsen verantwortlich ist.

Aktivitätsabhängige Verfeinerung im Laufe der Entwicklung ist für eine Reihe von Systemen bekannt. Allerdings reduzierte sich der Großteil der Forschung auf erregende Synapsen. So wurde zum Beispiel aktivitätsabhängige Eliminierung für exzitatorische Synapsen an der neuromuskulären Endplatte (Lichtman and Colman, 2000; Keller-Peck et al., 2001), im visuellen Kortex (Chapman et al., 1986; Katz and Shatz, 1996), im Kleinhirn (Ichise et al., 2000; Kakizawa et al., 2000) und im somatosensorischen Kortex (O'Leary et al., 1994; Stern et al., 2001) gezeigt. Über die aktivitätsabhängige Eliminierung von inhibitorischen Synapsen ist jedoch wenig bekannt. Im auditorischen System konzentrierte sich die Aufmerksamkeit auf die hemmenden Eingänge zur LSO (siehe 2.2), dem für die Verarbeitung der interauralen Intensitätsdifferenzen verantwortlichen Kerngebiet. Die Zellen der LSO bekommen inhibitorische Eingänge von contralateral über den MNTB, die im adulten Stadium auf einen kleinen Teilbereich innerhalb der LSO projizieren. Sanes und Takacs zeigten, dass bei Blockade normaler neuronaler Aktivität die Axonterminalen von MNTB-Zellen in der LSO im Laufe der Entwicklung nicht auf einen Frequenzbereich beschränkt werden (Sanes and Takacs, 1993). Diese Studie beschäftigt sich allerdings mit den Eingängen zu einer Population von Zellen, und nicht mit der Entwicklung von Eingängen auf der Ebene einer einzelnen Zelle. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse sind also das erste Beispiel für eine erfahrungsabhängige Beschränkung von inhibitorischen Synapsen auf der Ebene einer einzelnen Zelle.

Die Gesamtdichte der Glyzinrezeptoren auf den Somata der MSO-Zellen nahm zwischen dem juvenilen Stadium vor Hörbeginn und dem Erwachsenenstadium nicht zu (Kapfer et al., 2002). Das spricht dafür, dass die Synapsen auf den Dendriten tatsächlich eliminiert, und nicht nur in Richtung Soma verschoben wurden. Der Mechanismus einer Eliminierung von glyzinerger Synapsen auf den Dendriten bleibt unklar. Wenn man davon ausgeht, dass nur die Synapsen auf dem Soma schnell genug mit ihrer Information zu der Gesamtantwort der Zelle beitragen können, so erscheint ein Mechanismus möglich, der spezifisch zu langsame Projektionen schwächt und schließlich abbaut.

Ein Mechanismus, mit dem gezielt bestimmte Eingänge gestärkt oder geschwächt werden können, ist die Potenzierung oder Abschwächung synaptischer Übertragung. Synapsen auf den Dendriten könnten unterdrückt und als Konsequenz eliminiert werden. Glyzinerge Synapsen auf dem Soma könnten potenziert und verstärkt werden.

Im Gegensatz zu exzitatorischen Synapsen ist Langzeitpotenzierung bzw. -depression (engl. long-term potentiation, LTP, bzw. long-term depression, LTD) bei inhibitorischen Synapsen nur in wenigen Fällen untersucht und beschrieben worden (vgl. Stelzer et al., 1987). Im Kleinhirn wurde gezeigt, dass GABAerge Inhibition (Transmitter γ -Aminobuttersäure) je nach Stimulationsprotokoll gestärkt oder geschwächt werden kann (Aizenman et al., 1998). Ebenso können GABAerge Eingänge auf kortikale Pyramidenzellen je nach zeitlicher Relation von prä- und postsynaptischer Aktivität LTP oder LTD zeigen (Holmgren and Zilberter, 2001). Neben GABAerger Inhibition zeigt aber auch glyzinerge übertragene Hemmung die Fähigkeit zur Langzeitverstärkung (Korn et al., 1992; Oda et al., 1998). Im auditorischen System der Säuger, und damit am interessantesten für unsere Hypothese, wurde für die glyzinerge Projektion des MNTB zur LSO die Fähigkeit zu LTD nachgewiesen (Kotak and Sanes, 2000; Chang et al., 2003). Die selektive Potenzierung bzw. Depression von glyzinerger Synapsen am Soma oder an Dendriten der MSO könnte also ein Mittel sein, um Synapsen aufgrund unterschiedlicher zeitlicher Eigenschaften zu eliminieren oder zu stärken. Das omnidirektionale Rauschen führt zu einer unkorrelierten Aktivierung der Synapsen und verhindert somit, dass diese glyzinerger Eingänge aufgrund ihres Beitrags zur Gesamtantwort der Zelle korrekt beurteilt werden können.

5.2 FEHLENDE RÄUMLICHE BEGRENZUNG DER INHIBITORISCHEN SYNAPSEN AN MSO-ZELLEN DER RATTE

Wir haben gezeigt, dass es bei der Ratte zu keiner Änderung der räumlichen Verteilung von glyzinerger Synapsen im Laufe der Entwicklung kommt. Anders als bei der Wüstenrennmaus gibt es bei der Ratte offensichtlich keine erfahrungsabhängige Eliminierung der glyzinerger Synapsen an MSO-Neuronen.

Die fehlende Beschränkung der glyzinerger Synapsen bei adulten Ratten im Gegensatz zur Wüstenrennmaus korreliert nicht nur mit dem unterschiedlichen Audiogramm, sondern auch mit einer deutlich geringeren Auflösung von ITDs, wie es für MSO-Neurone in Albinoratten *in vivo* gezeigt wurde, überein (Inbody and Feng, 1981). In der Ratten MSO wurde nur für Neurone mit einer BF von über 2,2 kHz gefunden (konsistent mit dem Audiogramm der Ratte, Sprague-Dawley Albino, Kelly and Masterton, 1977), und da auditorische Neurone von Säugern über 2 kHz keine Phasenkopplung mehr zeigen (Grothe, 2000), scheint es nicht verwunderlich, dass keine IPD-Selektivität gefunden wurde. Diese Ergebnisse decken sich mit der schlechten Schalllokalisationsfähigkeit von tiefen Frequenzen bei der Ratte (Kelly and Phillips, 1991).

Widersprüchlich zu den bis dato gefundenen Höreigenschaften der Ratte stehen Ergebnisse von Paolini et al. (Paolini et al., 2001). Hier werden Zellen im auditorischen Hirnstamm beschrieben, deren tieffrequente BFs sich nicht mit den sonst gemessenen Audiogrammen decken. Ein möglicher Grund für die Diskrepanz könnte im unterschiedlichen Hörvermögen der in der Studie von Paolini et al. benützten Long-Evans hooded Ratte, und der in meisten anderen Studien, wie auch von uns, verwendet Albinoratten liegen. Ob es tatsächlich Unterschiede in der Anatomie oder in der binauralen Informationsverarbeitung zwischen den verschiedenen Rattentypen gibt muss durch weitere Versuche geklärt werden.

MSO-Zellen von Tieren mit gutem Hörvermögen im tieffrequenten Bereich zeigen also eine Beschränkung der glyzinerger und somit hemmenden Eingänge auf das Soma (Katze: Clark, 1969; Chinchilla: Perkins, 1973; Wüstenrennmaus: Seidl, 1999; Kapfer et al., 2002). Bei Tieren wie Ratten, Opossums oder Fledermäusen, die nur schwaches Hörvermögen im tieffrequenten Bereich besitzen und ergo keine ITDs benützen, gibt es diese Entwicklung nicht (Kapfer et al., 2002). Hier erschienen die Zellen der MSO

weitaus weniger strukturiert (Abbildung 37 und Abbildung 38) und eine Beschränkung der inhibitorischen Eingänge auf das Soma war nicht nachzuweisen (Abbildung 43).

Die spezifische Anordnung der glyzinergen Synapsen bei tieffrequent hörenden Tieren stellt also eine Anpassung an die Verarbeitung von ITDs dar.

5.3 ITD-SENSITIVITÄT IM DNLL

Um die ITD-Sensitivität von Wüstenrennmäusen in verschiedenen Entwicklungsstadien und mit veränderter Hörerfahrung zu vergleichen, wurden die ITD-Funktionen im DNLL von verschiedenen Tiergruppen gegenübergestellt. Die ITD-Empfindlichkeit im DNLL der adulten Wüstenrennmaus zeigte die gleichen Eigenschaften, die bereits für die MSO (Brand et al., 2002) und den IC (McAlpine et al., 2001; Hancock and Delgutte, 2003) gefunden wurden. Betrachtet man die besten ITDs als Funktion zur Bestfrequenz, so sind die besten ITDs umgekehrt proportional zur Bestfrequenz, das heißt, je kleiner die Bestfrequenz desto größer ist im Mittel der Wert für die beste ITD. Diese Beziehung resultiert in einer systematischen Anordnung der besten IPDs für alle Bestfrequenzen um einen konstanten Wert ($IPD = ITD \times BF$). Dieses Phänomen wurde erstmals im auditorischen Mittelhirn des Meerschweinchens (McAlpine et al., 2001) und etwas später für die erste Station der ITD-Kodierung, die MSO, in der Wüstenrennmaus beschrieben (Brand et al., 2002). Erst kürzlich wurde das gleiche Verhältnis von bester ITD und BF bei der Katze, einem Tier mit einem relativ größeren Kopf, beschrieben (Hancock and Delgutte, 2003). Daher ist anzunehmen, dass die gefundene Beziehung zwischen bester ITD und BF nicht ein spezifisches Phänomen bei Tieren mit kleinem Ohrabstand ist, sondern ein für alle Säugetiere gültiges Prinzip. In allen drei Studien gibt es keine systematische Verteilung der besten ITDs über den physiologischen Bereich des untersuchten Tieres. Vielmehr liegt der Großteil der maximalen Antworten außerhalb des physiologisch relevanten Bereiches (McAlpine et al., 2001; Brand et al., 2002; Hancock and Delgutte, 2003).

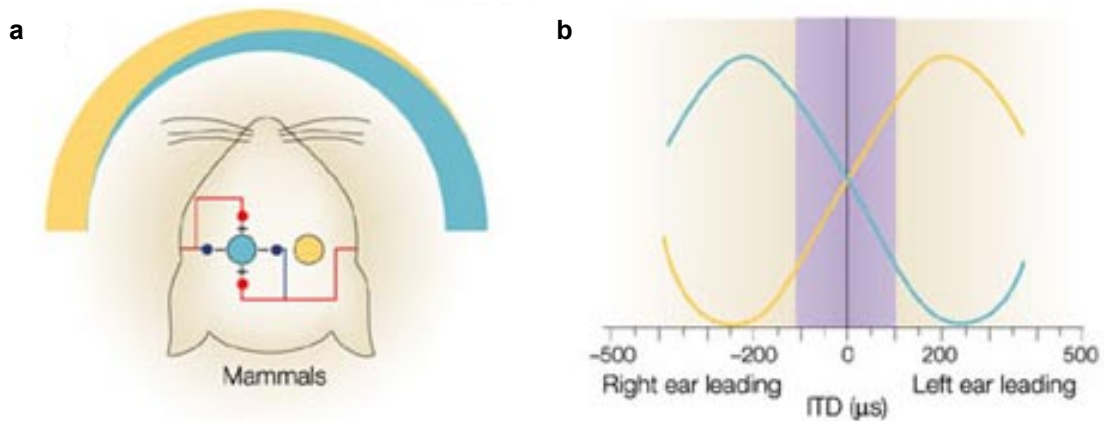


Abbildung 94 Neues Konzept für die Verarbeitung von ITDs

Das neue Bild der MSO zeigt, dass bereits einzelne Neurone in der Lage sind verschiedene ITDs zu kodieren. Je nach Lage der Schallquelle im Azimut ändert sich die Feuerrate einer Zelle. Schall aus der contralateralen Hemisphäre resultiert in hohen Antwortraten und umgekehrt. Da die maximalen Steigungen immer bei einer ITD um 0 liegen, ergibt sich ein hohes Auflösungsvermögen um die Mittellinie. Abbildung aus 'New roles for synaptic inhibition in sound localization', B. Grothe, Nature Reviews Neuroscience, Volume 4, July 2003, (Grothe, 2003).

Die hier gezeigten Ableitungen vom DNLL zeigen ebenfalls dieses Antwortverhalten. Der DNLL spiegelte die Eigenschaften der MSO in Bezug auf ITD-Empfindlichkeit fast perfekt wieder. Die Werte für die mittlere beste ITD und die Modulation der Feuerrate im physiologischen Bereich stimmten fast überein. Wie schon in den bereits beschriebenen Studien gezeigt, gibt es bei den ITD-Funktionen im DNLL einen klaren Zusammenhang zwischen bester ITD und BF. Der Großteil der maximalen Antwortraten lag außerhalb des physiologisch relevanten Bereiches, es gibt keine systematische Verteilung von besten ITDs innerhalb dieser Bandbreite von ITDs. Ebenso lag der Mittelwert der maximalen Steigungen nahe 0 ITD, und über 80 % aller Zellen hatten die maximale Steigung ihrer ITD-Funktion in diesem Bereich. Wären die besten ITDs nur deshalb nicht ausschließlich im physiologischen Bereich angeordnet, weil sie gleichmäßig über den gesamten theoretisch möglichen Bereich verteilt sind, so würde man eine andere als von uns beobachtete Verteilung erwarten. Die in Abbildung 95 gezeigte Verteilung unserer Daten zeigt keineswegs ein solches gleichmäßiges Muster, die besten ITDs sind nicht über den gesamten theoretischen Bereich verteilt.

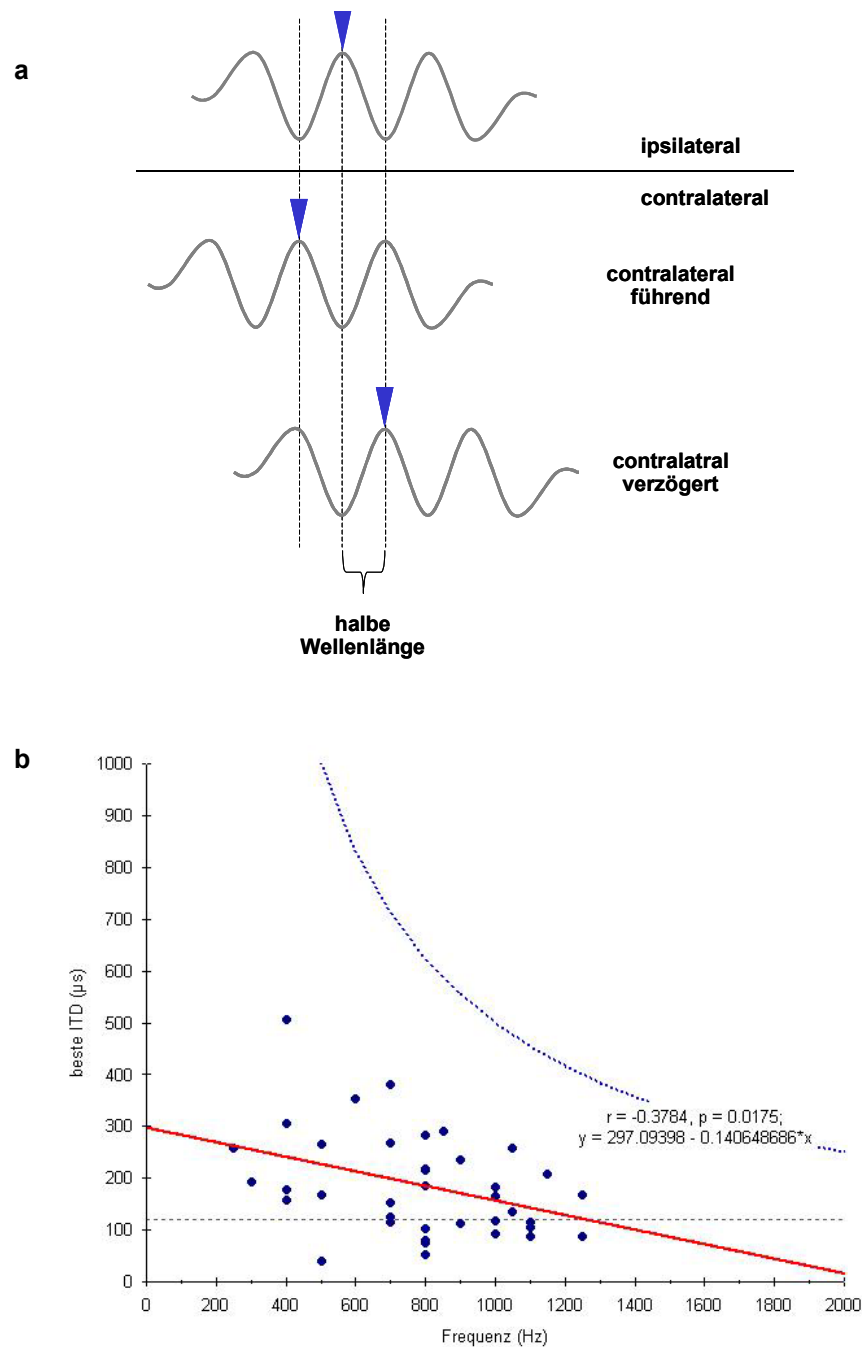


Abbildung 95 Theoretisch mögliche Bandbreite von besten ITDs und gemessene beste ITDs

Die besten ITDs sind nicht gleichmäßig über das gesamte mögliche Spektrum verteilt. **a**, Theoretisch mögliche ITDs werden definiert über die Wellenlänge. Überschreiten die ITDs die halbe Wellenlänge, so wiederholt sich das Antwortmuster. **b**, Verteilung der besten ITDs als Funktion der BF. Die gestrichelte blaue Linie gibt den Bereich der theoretisch möglichen besten ITDs an. Die gemessenen besten ITDs sind nicht über den gesamten möglichen Bereich verteilt, sondern systematisch. Die besten ITDs steigen mit abnehmender BF signifikant an ($P = 0,0175$).

Abbildung 58 zeigt das Verhältnis von charakteristischer Verzögerung (CD) und BF. Hier lässt sich ein leichter Trend hin zu längeren CDs bei abnehmender BF feststellen, was in etwa vergleichbar ist mit den Ergebnissen von McAlpine et al. im Meerschweinchen ((McAlpine et al., 1996); vgl. Abbildung 13). Dort gibt es eine zunehmende Abnahme von sehr langen CDs bei BFs unter 150 Hz hin zu CDs um 0 bei höheren Frequenzen. Grundsätzlich sollten bei ‚peak-type‘ Neuronen die Werte für die CD mit der besten ITD übereinstimmen. Da es aber nicht in jedem Fall reine ‚peakers‘ gibt, können die beiden Werte voneinander abweichen. Die CD als Funktion der CP verhält sich im DNLL der Wüstenrennmaus nicht ähnlich wie im IC des Meerschweinchens (Abbildung 61 und Abbildung 15A in McAlpine et al., 1996). Mit zunehmenden negativen CDs verlagert sich die CP vom ‚peak‘ der ITD-Funktionen (CPs um 0) über die Flanke zum ‚trough‘ am Minimum der ITD-Funktion (CPs nahe 0,5). Grundsätzlich sind die Werte für die besten ITDs und die CDs nicht immer miteinander vergleichbar. Die CD ist, ebenso wie die CP, ein rechnerisch ermittelter Wert, der wohl nur dann genau ermittelt werden kann wenn die ITD-Sensitivität einer Zelle bei sehr vielen Frequenzen und sehr vielen Stimuluswiederholungen gemessen wurde.

Da Ableitungen in der MSO wiederholt als sehr schwierig beschrieben wurden (Goldberg and Brown, 1969; Guinan, Jr. et al., 1972; Caird and Klinke, 1983; Yin and Chan, 1990; Spitzer and Semple, 1995), stellt die Messung von ITD-Sensitivität im DNLL eine geeignete Alternative dar, um Zellpopulationen miteinander zu vergleichen. Die Einzelzelleableitungen im DNLL zeigen in ihren prinzipiellen Eigenschaften starke Übereinstimmung mit ITD-Funktionen in der MSO. Darüber hinaus ist eine intakte MSO notwendig für Schalllokalisation im Azimut (Casseday and Neff, 1975).

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die ITD-Empfindlichkeit im DNLL von einer dritten Seite beeinflusst wird. Der DNLL erhält beispielsweise einen hemmenden Eingang vom contralateralen DNLL, dessen ITD-sensitive Zellen somit die ITD-Empfindlichkeit beeinflussen könnten. Aufgrund der zeitlichen Verzögerung dieses Eingangs (eine Synapse mehr) würde man erwarten, dass dieses Signal auf die Ongoing-Komponente wirkt. Eine Analyse der besten IPD der Onset- und Ongoing-Komponenten erbrachte aber keine Evidenz für einen Unterschied (Abbildung 62). Einzig bei einer Erhöhung der Stimulusamplitude 40 dB über der Reizschwelle zeigte sich bei einigen Zellen mit zunehmender Amplitude ein größerer Unterschied zwischen bester IPD der Onset- und Ongoingkomponente (Abbildung 70). Demnach könnte es

sein, dass manche Zellen einen hemmenden Eingang vom contralateralen DNLL bekommen, andere aber nicht.

5.4 ERFAHRUNGSABHÄNGIGE ENTWICKLUNG DER ITD-SENSITIVITÄT

Einzelzelleableitungen im DNLL zeigen, dass es eine Entwicklung der ITD-Empfindlichkeit von einem Zeitpunkt kurz nach Hörbeginn bis zum Erwachsenenstadium gibt. ITD-Funktionen in jungen Tieren kurz nach Hörbeginn hatten beste ITDs um 0, wohingegen in erwachsenen Tieren die mittlere beste ITD signifikant in den Bereich der contralateral führenden ITDs verschoben war. Durch diese Abstimmung lagen die maximalen Steigungen der ITD-Funktionen beim adulten Tier nahe der Mittellinie. DNLL-Neurone von Tieren, die in omnidirektionalem Rauschen aufgewachsen waren, zeigten ITD-Funktionen mit maximalen Antworten, die um eine ITD von 0 verteilt waren und sich darin nicht von den ITD-Funktionen von jungen Tieren unterschieden. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen weiter, dass die Entwicklung dieser adulten ITD-Sensitivität von räumlicher Hörerfahrung in einer kritischen Periode nach Hörbeginn abhängig war. Wurden erwachsene Tiere dem omnidirektionalen Rauschen für den gleichen Zeitraum ausgesetzt wie die jungen Tiere, so wurde deren ITD-Sensitivität nicht anhaltend beeinflusst. Ein entscheidender Schritt in der Entwicklung der ITD-Empfindlichkeit konnte also durch Aufwachsen in Rauschen verhindert werden.

Interessanterweise waren die nicht abgestimmten ITD-Funktionen von jungen Tieren und in weißem Rauschen aufgewachsenen Tieren im Durchschnitt nicht unterschiedlich von den ITD-Funktionen, die an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus bei Blockade von glyzinerger Transmission gemessen wurden (Brand et al., 2002).

Obwohl wir Auswirkungen des weißen Rauschens auf die Entwicklung der erregenden Eingänge nicht ausschließen können, liegt ein Zusammenhang mit der von uns gezeigten räumlichen Entwicklung der glyzinerger Synapsen an MSO-Zellen nahe (Seidl, 1999; Kapfer et al., 2002). Vorausgesetzt, dass die im DNLL gemessene ITD-Sensitivität tatsächlich, wovon wir ausgehen (s.o.), die der MSO widerspiegelt, kann man annehmen, dass die Restriktion der inhibitorischen Eingänge einen funktionellen Beitrag zur ITD-Verarbeitung leistet.

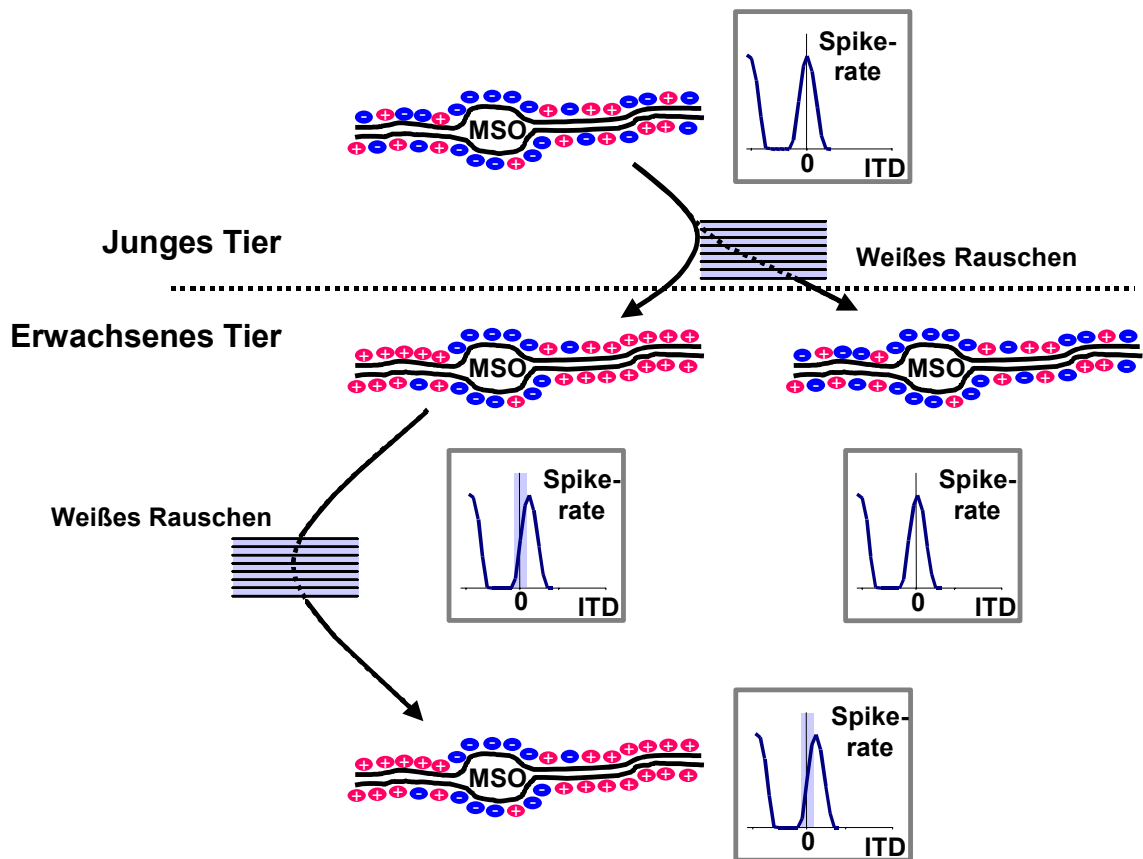


Abbildung 96 Korrelation zwischen der Entwicklung glyzinerger Synapsen an der MSO und der ITD-Empfindlichkeit

Das Diagramm zeigt die Entwicklungsstufen der Verteilung der glyzinerger Synapsen an einem beispielhaften MSO-Neuron und der ITD-Funktionen. Die Verteilung der inhibitorischen Eingänge korrelieren mit dem Antwortverhalten der ITD-Funktionen. Sind sie auf das Soma beschränkt, werden die ITD-Funktionen so abgestimmt, dass die maximalen Steigungen innerhalb des physiologischen Bereiches liegen und eine optimale Basis für die Kodierung von ITDs darstellen. Hat die Eliminierung der glyzinerger Synapsen auf den Dendriten noch nicht stattgefunden (junge Tiere), oder wurde sie durch omnidirektionales weißes Rauschen unterdrückt (NRA Tiere), so ist die mittlere maximale Antwort der ITD-Kurven nahe einer ITD von 0, und die maximalen Steigungen sind nicht konsistent auf den physiologisch relevanten Bereich abgestimmt.

In einer kürzlich erschienenen Studie wird die Entwicklung des inhibitorischen Eingangs einer anderen auditorischen Hirnstammstruktur, der LSO, bei der Ratte untersucht (siehe 2.2 und Abbildung 2) (Kim and Kandler, 2003). Hier werden die inhibitorischen Axonterminalen auf einen bestimmten Frequenzbereich verfeinert. Kim und Kandler zeigen, dass das Gros der Verfeinerung bereits vor P8 stattfindet, zu einem Zeitpunkt da sensorische Aktivität noch nicht vorhanden sein kann (Hörbeginn bei P12), und zu einem Zeitpunkt da der glyzinerge Eingang aufgrund einer hohen intrazellulären Cl^- -Konzentration depolarisierend wirkt. Daher wird hier postuliert, dass die Plastizität inhibitorischer Synapsen auf den Zeitrahmen beschränkt ist, in dem sie

depolarisierend wirken. Aufgrund der Korrelation der ITD-Sensitivität mit der Verteilung der glyzinerger Synapsen an MSO-Neuronen, zeigt vorliegende Arbeit, dass es sehr wohl Plastizität bei hyperpolarisierend wirkenden hemmenden Synapsen geben kann.

Ein mögliches Prinzip, wie zeitlich präzise Inhibition an der MSO die Abstimmung der ITD-Funktionen erzielen könnte, wurde von Grothe vorgeschlagen (Abbildung 97 Grothe, 2003). Ohne zeitlich genaue, phasengekoppelte Inhibition von beiden Seiten würde das erregende Signal von beiden Seiten ohne interaurale Verzögerung an der MSO eintreffen und bei einer ITD von 0 würde es zur Koinzidenz, also zur maximalen Antwort kommen. Wenn die contralaterale Inhibition der contralateralen Erregung vorausläuft, resultiert dies in einer verzögerten Gesamtantwort auf das Signal von contralateral (Abbildung 97 oben). Das Signal von ipsilateral würde durch die nachlaufende Hemmung zeitlich nicht verschoben, aber etwas verkürzt, so dass das Zeitfenster für die Koinzidenz kleiner würde (Abbildung 97 unten). Eine Koinzidenz beider Signale liegt nur dann vor, wenn der Schall das contralaterale Ohr früher erreicht. Die resultierende ITD-Funktion wird also zu positiven ITDs verschoben.

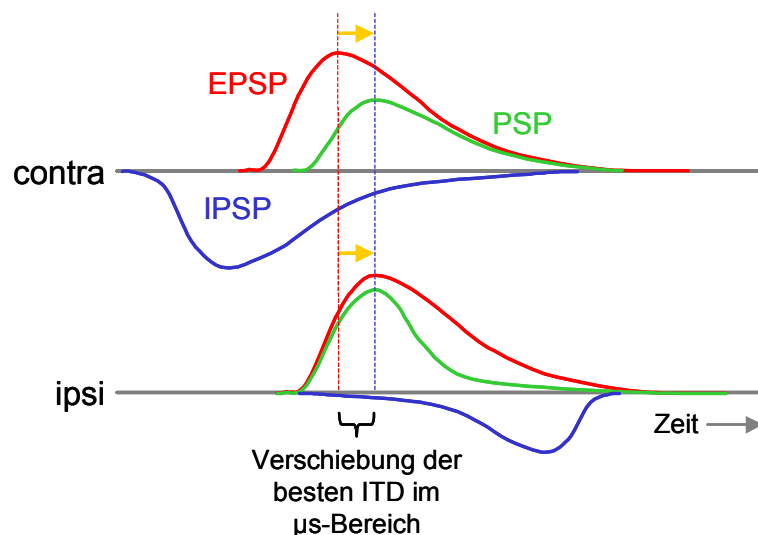


Abbildung 97 Funktionsweise einer vorlaufenden contralateralen Inhibition

Ohne Inhibition würden die erregenden Eingänge (EPSPs, rote Linie) von beiden Seiten ohne interaurale Verzögerung an der MSO eintreffen und bei einer ITD von 0 koinzidieren, also die maximale Antwort verursachen. Trifft die contralaterale Hemmung früher ein als das erregende Signal (IPSP, blaue Linie oben) so resultiert daraus ein verzögertes gesamtpostsynaptisches Potential (PSP, grüne Linie oben). Eine ipsilaterale Hemmung, die der Erregung der gleichen Seite nachfolgt, verkürzt die Dauer des Signals und limitiert so dessen zeitliche Wirkung. Damit beide postsynaptischen Potentiale zur Deckung kommen, muss das Signal der contralateralen Seite vor dem der ipsilateralen Seite eintreffen. Rote Linie: Koinzidenz ohne Hemmung. Blaue Linie: Koinzidenz mit Hemmung. Abbildung modifiziert nach (Grothe, 2003).

Diese Wirkungsweise der Inhibition setzt eine zeitlich präzise Übertragung im Mikrosekundenbereich voraus. Beide inhibitorischen Projektionen zur MSO zeigen Merkmale für schnelle synaptische Transmission (siehe 2.2.1). Die Restriktion der glyzineren Eingänge auf das Soma könnte also eine weitere Spezialisierung für schnelle synaptische Signaltransduktion darstellen.

Das Modell, vereinfacht (ohne ipsilaterale Inhibition) verwirklicht von Torsten Marquardt (Brand et al., 2002), demonstriert, dass mit einer phasengekoppelten Inhibition vom MNTB, die der Erregung von contralateral vorausläuft, eine Verschiebung der besten ITD hin zu contralateralen ITDs möglich ist. Das Modell basiert auf sehr schneller Kinetik ($\tau = 0,1$ ms), bis dato unbekannt für inhibitorische Synapsen. Vorläufige Ergebnisse, gewonnen von Christoph Kapfer aus unserem Labor durch *patch-clamp* Elektrophysiologie *in vitro* an MSO-Neuronen von Wüstenrennmäusen, zeigen allerdings, dass Übertragungszeiten von glyzineren Synapsen im Rahmen von 500 bis 600 μ s prinzipiell möglich sind (Kapfer, 2003). Ausführliche Messungen an Ratten MSO-Neuronen zeigen zwar deutlich langsamere glyzinerge Transmission (4 ms, Smith et al., 2000), die Ergebnisse aus der Ratte können jedoch nicht ohne weiteres auf die Wüstenrennmaus übertragen werden. Die Messungen an der MSO der Ratte wurden spätestens 14 Tage nach der Geburt, also erst zwei Tage nach Hörbeginn vorgenommen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Entwicklung der glyzineren Transmission wohl noch nicht abgeschlossen (Sanes, 1993). Die Verteilung der inhibitorischen Synapsen an MSO-Neuronen der Ratte ist, wie in dieser Arbeit gezeigt, substantiell unterschiedlich zur adulten Wüstenrennmaus. Außerdem sind ITDs für die Ratte nicht das primäre Merkmal zur tieffrequenten Schalllokalisation, daher erfüllt hier die MSO nicht dieselben Aufgaben wie in der Wüstenrennmaus und die glyzinerge Hemmung kann somit nicht für die Abstimmung der ITD-Empfindlichkeit im Mikrosekundenbereich verantwortlich sein.

Ein weiteres Indiz für die schnellen Übertragungsgeschwindigkeiten zeigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von inhibitorischen Synapsen. Die Vergrößerung von Abbildung 34 zeigt die dichte Anordnung von präsynaptischen Vesikeln einer glyzineren Synapse. Die Aufgabe solcher Cluster könnte die rasche Erneuerung von ausgeschütteten Vesikeln sein, und damit ein Indiz für schnelle synaptische Übertragung.

Die zeitliche Genauigkeit der hemmenden Eingänge scheint von grundlegender Bedeutung für die ITD-Empfindlichkeit zu sein. Daher ist es möglich, dass die

Restriktion der hemmenden Eingänge auf das Soma nach Hörbeginn auf einem Mechanismus basiert, der Synapsen nach ihrer synaptischen Korrelation beurteilt und gezielt eliminiert. Natürliche Höraktivität, d.h. das Auftreten von natürlichen ITDs, wäre für diesen Mechanismus notwendig. Ein Modell von Christian Leibold zeigt, dass eine selbstorganisierte Selektion von glyzinergen Synapsen aufgrund verschiedener Zeitkonstanten möglich ist (Leibold and van Hemmen, 2003). Synapsen, die nicht innerhalb eines Zeitfensters zur korrekten Verarbeitung von ITDs in der MSO beitragen, werden eliminiert, solche, die innerhalb des Zeitfensters Transmission zeigen, werden verstärkt.

Erfahrungsabhängige Effekte während der Ontogenie räumlicher Wahrnehmungsmechanismen sind bereits für Säuger und die Schleiereule beschrieben worden. Der superiore Colliculus (SC) von Meerschweinchen bedarf sowohl visueller als auch akustischer Information, um die auditorische Raumkarte korrekt auszubilden. Wird eine der beiden Sinneseindrücke durch Dunkelaufzucht bzw. weißes Rauschen während einer kritischen Periode unterdrückt, so kann sich diese Karte nicht entwickeln (Withington-Wray, 1990a; Withington-Wray, 1990b). Das Zusammenwirken von visueller und akustischer Erfahrung ist also notwendig, um die akustische Raumkarte im SC zu etablieren.

Extensive Studien über angeleitetes Lernen von Schalllokalisation sind in der Schleiereule durchgeführt worden (Übersichtsarbeit: Knudsen, 2002). Auf der Ebene eines Teilbereiches des auditorischen Mittelhirns des Vogels, im externen Nukleus des auditorischen Mittelhirns (engl. external nucleus of the inferior colliculus, ICX), wurde gezeigt, dass sich die topographische Abbildung des akustischen Raumes an eine veränderte visuelle Abbildung anpasst. Die ITD-Empfindlichkeit wird verschoben und so dem mit Prismen verschobenen visuellen Feld angepasst (Knudsen and Knudsen, 1990; Gold and Knudsen, 2000). Im Gegensatz zu unserer Studie findet die Plastizität bei der Schleiereule allerdings nicht auf der Ebene des eigentlichen ITD-Detektors statt. Im ICX werden akustische und visuelle Information aufeinander abgestimmt, wobei der visuelle Eingang als Referenz für die auditorische Information dient.

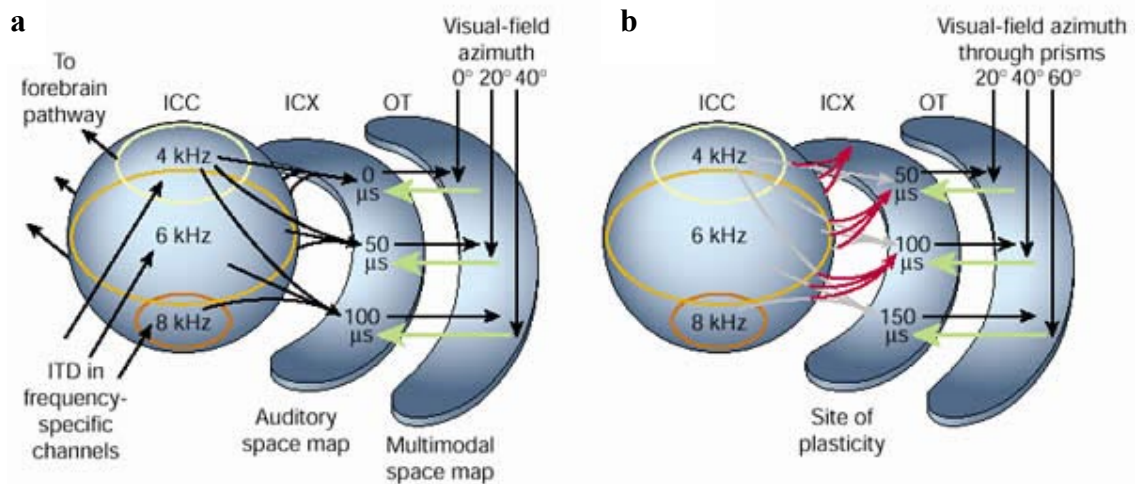


Abbildung 98 Effekt der verschobenen visuellen rezeptiven Felder auf den Informationsfluss im auditorischen Mittelhirn bei der Schleiereule

a, Signalübertragungswege in der normalen Eule. Der zentrale Nukleus des inferioren Colliculus (ICC) bekommt ITD-spezifische Eingänge aus dem Stammhirn, der ersten Ebene der ITD-Detektion, in frequenzspezifischen Kanälen. Im externen Nukleus des IC (ICX) werden die verschiedenen Frequenzkanäle nach ITD-Empfindlichkeit gebündelt, und die entstehende Raumkarte wird an das optische Tektum (OT) weitergegeben, wo sie mit der visuellen Karte in Deckung gebracht wird. **b,** Veränderte auditorische Raumkarte in einer mit Prismen vor den Augen aufgewachsenen Schleiereule. Instruktive Projektionen aus dem OT stimmen die akustische Raumkarte bereits auf der Ebene des ICX ab. Abbildung aus 'Instructed learning in the auditory localization pathway of the barn owl', E. Knudsen, Nature, Volume 417, 16 Mai 2003, (Knudsen, 2002).

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse kann angenommen werden, dass die Plastizität der ITD-Sensitivität auf einer strukturellen Veränderung auf der Ebene des ITD-Detektors selbst, der MSO, beruht. Dadurch wird die Verarbeitung von ITDs direkt beeinflusst. Ein weiterer Unterschied zu der in dieser Arbeit dargestellten Studie ist, dass die Plastizität der ITD-Empfindlichkeit in der Schleiereule, ähnlich wie im SC des Meerschweinchens, durch visuelle Projektionen aus dem optischen Tektum angeleitet wird. Bis dato ist jedoch kein visueller Eingang zur MSO bekannt und daher ist anzunehmen, dass eine Mitwirkung visueller Information bei der Entwicklung der ITD-Sensitivität keine Rolle spielt. Die Abstimmung der ITD-Empfindlichkeit im Laufe der Entwicklung ist also selbstorganisiert.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass akustische Erfahrung in einem bestimmten Zeitraum früh in der Entwicklung notwendig ist, um eine bestimmte Sensitivität für Orientierungsmechanismen im Raum zu erlangen. Ob diese Erfahrung notwendig ist, um diese Sensitivität aufrechtzuerhalten, ist nicht endgültig geklärt. Omnidirektionales Rauschen im Erwachsenenalter, zu einem Zeitpunkt da der

Mechanismus zur Schalllokalisation bereits ausgebildet ist, führt jedoch zu keiner Rückkehr zum unreifen Stadium der ITD-Sensitivität. Im visuellen Kortex (V1) ist jedoch Aktivität notwendig, um die normale Kartentopographie aufrechtzuerhalten (Crair et al., 1998; Crowley and Katz, 2000). Interessanterweise scheint die korrekte Entwicklung der Darstellung von Schnurrhaaren im somatosensorischen Kortex der Ratte vergleichbar dem hier vorgestellten Prinzip abzulaufen. Die Ausbildung einer normalen Abbildung in der Schicht 2/3 bedarf normaler Aktivität in einem bestimmten Zeitraum und ist dann unempfindlich für Deprivation (Stern et al., 2001).

5.5 ADULTE PLASTIZITÄT DER ITD-EMPFINDLICHKEIT

Ein Teil der Experimente wurde mit erwachsenen Tieren durchgeführt, die dem weißen Rauschen für den gleichen Zeitraum wie die jungen Tiere ausgesetzt waren. Die in dieser Gruppe 11 bis 26 Tage nach Rauschexposition gewonnenen ITD-Funktionen zeigten prinzipiell die gleichen Eigenschaften wie die der Kontrollgruppe, ihre mittlere beste IPD war jedoch signifikant erhöht (Abbildung 88 und Abbildung 91). Vorläufige Ergebnisse von einem Tier, das erst 137 Tage nach dem 15tägigen Aufenthalt in der Noisebox auf seine ITD-Empfindlichkeit im DNLL untersucht wurde, scheinen darauf hinzudeuten, dass sich nach einiger Zeit ohne permanente akustische Stimulation die mittlere beste IPD wieder in Richtung der Kontrolltiere verändert (Abbildung 93).

Eine Verschiebung hin zu größeren IPDs ist nach dem Modell von Torsten Marquardt alleine durch eine Verstärkung der inhibitorischen Transmission möglich (Brand et al., 2002). Wird die glyzinerge Hemmung stärker, so kann das exzitatorische Signal der contralateralen Seite noch weiter verzögert werden, wodurch es erst bei noch höheren ITDs zur Koinzidenz von beiden Eingängen kommt (vgl. Abbildung 97).

Die Plastizität der ITD-Sensitivität im Erwachsenenstadium könnte daher auf eine Verstärkung der glyzineren Transmission zurückzuführen sein. In der Literatur finden sich viele Belege dafür, dass inhibitorische Transmission nach starker oder ungewöhnlicher Stimulation hochreguliert sein kann (Welker et al., 1989; Liang et al., 1996; Sloviter et al., 1996). Die ständige Aktivierung der inhibitorischen Eingänge der MSO durch das weiße Rauschen könnte also dazu führen, dass sich zwar die Verteilung der glyzineren Synapsen nicht verändert, die Effektivität der vorhandenen Synapsen jedoch reversibel gesteigert wird. Eigene vorläufige Ergebnisse deuten an, dass dieser

Effekt nicht permanent ist (4.3.10). Ein laufendes Projekt in unserem Labor beschäftigt sich momentan mit dieser Frage und die Ergebnisse deuten darauf hin dass eine Mindesterholzeit von 14 Tagen ausreichend ist, um den Normalzustand wieder zu erreichen (Kollmar, 2003).

Es wurde also eine Plastizität der ITD-Empfindlichkeit im adulten Stadium nachgewiesen. Diese Plastizität ist reversibel (Kollmar, 2003). Anhand eines bereits veröffentlichten Modells lässt sich diese Plastizität mit der Hochregulierung von inhibitorischer synaptischer Aktivität erklären. Ob jedoch tatsächlich verstärkte glyzinerge Transmission auf Ebene der MSO für diesen Effekt verantwortlich ist, muss weiter untersucht werden.

5.6 AUSWIRKUNGEN DER AMPLITUDE UND VON IIDS AUF DIE ITD-EMPFINDLICHKEIT IM DNLL

Um eine eventuelle Abhängigkeit der ITD-Sensitivität auf Amplitudenmodulationen festzustellen, wurden ITDs bei verschiedenen Lautstärken gemessen. Die beste IPD von zehn verschiedenen DNLL-Zellen blieb bei einer Amplitudenänderung relativ stabil (Abbildung 63 und Tabelle 1). Es gibt bei den gemessenen ITD-Funktionen teilweise eine Verschiebung hin zu größeren oder kleineren besten IPDs. Diese Änderung ist jedoch nicht systematisch und relativ gering. Die maximale Steigung der einzelnen ITD-Funktion bleibt bei der Mehrzahl der Zellen bei einer Erhöhung der Stimulusamplitude innerhalb des physiologischen Bereiches (Abbildung 65).

Die Antwortraten einzelner Zellen zeigen jedoch teilweise starke Veränderung mit zunehmender Stimulusamplitude (Abbildung 66). Durch die zunehmende Lautstärke könnte bei einigen Zellen eine inhibitorische Komponente stärker zum Tragen kommen, so dass die Gesamtantwort dieser Zelle nicht weiter steigt. Welchen Ursprung dieser Eingang haben könnte ist nicht geklärt.

Die Feuerrate von Zellen des Nucleus Laminaris (NL), dem Analogon der MSO in Vögeln, ist bemerkenswert unsensitiv auf Veränderungen der Schallintensität (Pena et al., 1996). In einer *in vitro* Studie wird eine ‚gain-control‘ Hypothese vorgeschlagen, wobei der GABAerge Eingang die ITD-Sensitivität im NL unabhängig von der Stimulusintensität macht, indem er die Erregbarkeit der NL-Neurone anpasst. In einer kürzlich erschienen Veröffentlichung wurde systematische synaptische Unterdrückung

für die Stimulusunempfindlichkeit verantwortlich gemacht (Cook et al., 2003). Inwiefern derartige Mechanismen auch für die hier beobachteten Effekte verantwortlich sind kann nicht geklärt werden. Jedoch scheint es auch hier keinen spezifischen Unterschied zwischen Onset- und Ongoingkomponente zu geben (Abbildung 70), d.h. es gibt keinen Hinweis auf einen Einfluss der GABAergen Projektion vom contralateralen DNLL.

Inhibitorische Komponente die das Antwortverhalten von DNLL-Neuronen beeinflusst scheinen aber sehr wahrscheinlich. Das zeigen die nicht-monotonen monauralen und binauralen Ratenintensitätsfunktionen der einzelnen Zellen in Abbildung 71. Die IID-Sensitivität von ITD-sensitiven Zellen (Abbildung 72) sind ein weiterer Beleg dafür dass Inhibition bei veränderten Stimulusamplituden unterschiedlich wirkt. Die Frage hier ist, ob die jeweiligen inhibitorischen Mechanismen in der MSO oder im DNLL wirken. Zur weiteren Klärung des Ortes und der Funktion der hemmenden Mechanismen auf die ITD-Sensitivität im DNLL sind weitere Versuche nötig. Vor allem aber sollten bei verschiedenen Stimulusamplituden gemessene ITD-Funktionen von MSO- und DNLL-Neuronen verglichen werden.

5.7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Entwicklung der räumlichen Verteilung der glyzinerger Synapsen an MSO-Neuronen in der Wüstenrennmaus erfahrungsabhängig ist. Im adulten Tier sind die inhibitorischen Eingänge auf das Zellsoma beschränkt. In Säugerarten, die ITDs nicht zur Schalllokalisation benutzen, gibt es diese Entwicklung nicht. Sowohl vor Hörbeginn, also auch im adulten Tier sind die inhibitorischen Eingänge zu MSO-Neuronen gleichmäßig über Soma und Dendriten verteilt.

Die ITD-Sensitivität im DNLL der Wüstenrennmaus ist der der MSO sehr ähnlich, und ist somit aufgrund der größeren Erfolgsrate der Ableitungen besser geeignet um größere Populationen miteinander zu vergleichen. Messungen von ITD-Funktionen bei Wüstenrennmäusen zeigen, dass es eine Entwicklung der ITD-Sensitivität nach Hörbeginn gibt. Diese Entwicklung ist, wie die normale Entwicklung der Verteilung der glyzinerger Synapsen auf MSO-Zellen, abhängig von räumlicher akustischer Erfahrung.

Die Korrelation der anatomischen und physiologischen Ergebnisse legen nahe, dass die räumliche Segregation von inhibitorischen Eingängen auf Zellebene notwendig ist um die ITD-Sensitivität korrekt auszubilden.

5.8 AUSBLICK

Die vorgelegten Ergebnisse weisen auf die essentielle Rolle der Hörerfahrung in der Entwicklung hin. Nun muss allerdings untersucht werden, ob die nicht abgestimmte ITD-Sensitivität in den im Rauschen aufgewachsenen Wüstenrennmäusen auch im Verhaltensexperiment eine Veränderung in der Schalllokalisation zeigen. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Georg Klump soll diese Frage geklärt werden.

Das von Grothe vorgeschlagene Modell zur Wirkungsweise der Inhibition in Abbildung 97 (Grothe, 2003) kann mit extrazellulären Ableitungen wie mit den hier gezeigten Versuchen zur ITD-Sensitivität im DNLL nicht bewiesen werden. Ein möglicher Versuch mit dem das Konzept der vorlaufenden Inhibition direkt belegt werden könnte, wären *in vivo* Ableitungen an MSO-Neuronen mit der *patch-clamp* Technik.

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse sind ein Beispiel dafür, wie sich die neuronale Darstellung von topographischen Signalen während der Entwicklung verändert. Tatsächlich liegt aber schon zum frühesten von uns physiologisch untersuchten Zeitpunkt eine bemerkenswert hohe strukturelle Ordnung in der MSO vor. Isofrequente exzitatorische Eingänge der AVCNs von beiden Seiten müssen ihren Weg zu einer MSO-Zelle gefunden haben und so aufeinander abgestimmt sein, dass eine ITD von etwa 0 zur Koinzidenz führt. Zusätzlich dazu müssen auch noch die hemmenden Eingänge in bezug auf die Frequenz abgestimmt werden. Wie kommt es bereits vor Hörbeginn, also ohne den Einsatz jeglicher sensorischer Aktivität zu diesem hohen Organisationsgrad? Es könnte beispielsweise molekulare Mechanismen oder Konzentrationsgradienten geben, die für den präzise organisierten Aufbau solcher hoch funktioneller neuronaler Netzwerke verantwortlich sind. Die Bestimmung des genauen Zeitpunkts einer ersten Etablierung eines solchen Netzwerks und die Ermittlung der zugrunde liegenden Mechanismen bildet die Grundlage für neue Experimente.

6

LITERATUR

1. Agmon-snir H, Carr CE, Rinzel J (1998) The role of dendrites in auditory coincidence detection. *Nature* 393: 268-272.
2. Aizenman CD, Manis PB, Linden DJ (1998) Polarity of long-term synaptic gain change is related to postsynaptic spike firing at a cerebellar inhibitory synapse. *Neuron* 21: 827-835.
3. Batra R, Kuwada S, Fitzpatrick DC (1997a) Sensitivity to interaural temporal disparities of low- and high-frequency neurons in the superior olivary complex. I. Heterogeneity of responses. *J Neurophysiol* 78: 1222-1236.
4. Batra R, Kuwada S, Fitzpatrick DC (1997b) Sensitivity to interaural temporal disparities of low- and high-frequency neurons in the superior olivary complex. II. Coincidence detection. *J Neurophysiol* 78: 1237-1247.
5. Batra R, Kuwada S, Stanford Tr (1993) High-frequency neurons in the inferior colliculus that are sensitive to interaural delays of amplitude-modulated tones: evidence for dual binaural influences. *J Neurophysiol* 70: 64-80.
6. Beckius GE, Batra R, Oliver DL (1999) Axons from anteroventral cochlear nucleus that terminate in medial superior olive of cat: observations related to delay lines. *Journal of Neuroscience* 19: 3146-3161.
7. Brand, A. Precise Temporal Processing in the Gerbil Auditory Brainstem. 2003. Max-Planck-Institute of Neurobiology. Dissertation.
8. Brand A, Behrend O, Marquardt T, McAlpine D, Grothe B (2002) Precise inhibition is essential for microsecond interaural time difference coding. *Nature* 417: 543-547.
9. Brew HM, Forsythe ID (1995) Two voltage-dependent K⁺ conductances with complementary functions in postsynaptic integration at a central auditory synapse. *Journal of Neuroscience* 15: 8011-8022.
10. Caird D, Klinke R (1983) Processing of binaural stimuli by cat superior olivary complex neurons. *Experimental Brain Research* 52: 385-399.
11. Cant NB (1991) Projections to the Lateral and Medial Superior Olivary Nuclei from the Spherical and Globular Bushy Cells of the Anteroventral Cochlear Nucleus. In: *Neurobiology of Hearing: The Central Auditory System* Raven Press.

12. Cant NB, Hyson RL (1992) Projections from the lateral nucleus of the trapezoid body to the medial superior olivary nucleus in the gerbil. *Hearing Research* 58: 26-34.
13. Casseday JH, Neff WD (1975) Auditory localization: role of auditory pathways in brain stem of the cat. *J Neurophysiol* 38: 842-858.
14. Chang EF, Merzenich MM (2003) Environmental noise retards auditory cortical development. *Science* 300: 498-502.
15. Chang EH, Kotak VC, Sanes DH (2003) Long-Term Depression of Synaptic Inhibition Is Expressed Postsynaptically in the Developing Auditory System. *J Neurophysiol* 90: 1479-1488.
16. Chapman B, Jacobson MD, Reiter HO, Stryker MP (1986) Ocular dominance shift in kitten visual cortex caused by imbalance in retinal electrical activity. *Nature* 324: 154-156.
17. Clark GM (1969) The ultrastructure of nerve endings in the medial superior olive of the cat. *Brain Research* 14: 293-305.
18. Clark GM, Dunlop CW (1969) Poststimulus-time response patterns in the nuclei of the cat superior olivary complex. *Experimental Neurology* 23: 266-290.
19. Cook DL, Schwindt PC, Grande LA, Spain WJ (2003) Synaptic depression in the localization of sound. *Nature* 421: 66-70.
20. Crair MC, Gillespie DC, Stryker MP (1998) The Role of Visual Experience in the Development of Columns in Cat Visual Cortex. *Science* 279: 566.
21. Crow G, Rupert AL, Moushegian G (1978) Phase locking in monaural and binaural medullary neurons: implications for binaural phenomena. *J Acoust Soc Am* 64: 493-501.
22. Crowley JC, Katz LC (2000) Early development of ocular dominance columns. *Science* 290: 1321-1324.
23. Ehrhardt, Verena. Restriktion glycinерger Synapsen an der MSO. 1-7-2000. Max-Planck-Institut für Neurobiologie. Diplomarbeit.
24. Fitzpatrick DC, Kuwada S (2001) Tuning to interaural time differences across frequency. *Journal of Neuroscience* 21: 4844-4851.
25. Fitzpatrick DC, Kuwada S, Batra R (2000) Neural sensitivity to interaural time differences: Beyond the Jeffress model. *Journal of Neuroscience* 20: 1605-1615.

26. Forsythe ID, Barnes-Davies M (1993) The binaural auditory pathway: excitatory amino acid receptors mediate dual timecourse excitatory postsynaptic currents in the rat medial nucleus of the trapezoid body. *Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* 251: 151-157.
27. Galambos R, Davis H (1943) The response of single auditory-nerve fibres to acoustic stimulation. *J Neurophysiol* 9: 39-57.
28. Galambos R, Schwartzkopff J, Rupert A (1959) Microelectrode study of superior olivary nuclei. *Am J Physiol* 197: 527-536.
29. Gold JJ, Knudsen EI (2000) A site of auditory experience-dependent plasticity in the neural representation of auditory space in the barn owl's inferior colliculus. *Journal of Neuroscience* 20: 3469-3486.
30. Goldberg JM, Brown PB (1969) Response of binaural neurons of dog superior olivary complex to dichotic tonal stimuli: some physiological mechanisms of sound localization. *J Neurophysiol* 32: 613-636.
31. Grothe B (1994) Interaction of excitation and inhibition in processing of pure tone and amplitude-modulated stimuli in the medial superior olive of the mustached bat. *J Neurophysiol* 71: 706-721.
32. Grothe B (1997) Inhibition is essential for temporal processing in the auditory pathway. In: *Proceedings of the German Zoological Society (Zissler D, ed)*, pp 284. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
33. Grothe B (2000) The evolution of temporal processing in the medial superior olive, an auditory brainstem structure [Review]. *Progress in Neurobiology* 61: 581-610.
34. Grothe B (2003) New Roles for Synaptic Inhibition in Sound Localization. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 540-550.
35. Grothe B, Park TJ (1998) Sensitivity to interaural time differences in the medial superior olive of a small mammal, the Mexican free-tailed bat. *Journal of Neuroscience* 18: 6608-6622.
36. Grothe B, Park TJ, Schuller G (1997) Medial superior olive in the free-tailed bat: response to pure tones and amplitude-modulated tones. *J Neurophysiol* 77: 1553-1565.
37. Grothe B, Sanes DH (1993) Bilateral inhibition by glycinergic afferents in the medial superior olive. *J Neurophysiol* 69: 1192-1196.

38. Grothe B, Sanes DH (1994) Synaptic inhibition influences the temporal coding properties of medial superior olivary neurons: an in vitro study. *Journal of Neuroscience* 14: 1701-1709.
39. Grothe B, Vater M, Casseday JH, Covey E (1992) Monaural interaction of excitation and inhibition in the medial superior olive of the mustached bat: an adaptation for biosonar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 5108-5112.
40. Guinan JJ, Jr., Norris BE, Guinan SS (1972) Single Auditory Units in the Superior Olivary Complex II: Locations of Unit Categories and Tonotopic Organization. *International Journal of Neuroscience* 4.
41. Hancock, K. E. and Delgutte, B. Tuning to Interaural Time Differences in the Cat Inferior Colliculus: Dependence on Characteristic Frequency. *Association for Research in Otolaryngology* , 178. 2003.
42. Hashisaki GT, Rubel EW (1989) Effects of unilateral cochlea removal on anteroventral cochlear nucleus neurons in developing gerbils. *Journal of Comparative Neurology* 283: 5-73.
43. Heffner RS, Heffner HE (1988) Sound localization and use of binaural cues by the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Behavioral Neuroscience* 102: 422-428.
44. Heffner RS, Heffner HE (1990) The evolution of sound localization. In: *Comparative Perception I: Discrimination* (Berkley M, Stebbins W, eds), pp 285. New York: Wiley.
45. Holmgren CD, Zilberter Y (2001) Coincident spiking activity induces long-term changes in inhibition of neocortical pyramidal cells. *Journal of Neuroscience* 21: 8270-8277.
46. Huber G, Matus A (1984) Differences in the cellular distributions of two microtubule-associated proteins, MAP1 and MAP2, in rat brain. *Journal of Neuroscience* 4: 151-160.
47. Ichise T, Kano M, Hashimoto K, Yanagihara D, Nakao K, Shigemoto R, Katsuki M, Aiba A (2000) mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science* 288: 1832-1835.
48. Inbody SB, Feng AS (1981) Binaural response characteristics of single neurons in the medial superior olivary nucleus of the albino rat. *Brain Research* 210: 361-366.

49. Irvine DRF (1992) Physiology of the Auditory Brainstem. In: The Mammalian Auditory Pathway: Neurophysiology (Popper AN, Fay RR, eds), pp 153-231. New York: Springer.
50. Jeffress LA (1948) A place theory of sound localization. *Journal of Comparative Physiology and Psychology* 41: 35-39.
51. Joris PX (1996) Envelope coding in the lateral superior olive. II. Characteristic delays and comparison with responses in the medial superior olive. *J Neurophysiol* 76: 2137-2156.
52. Joris PX, Carney LH, Smith PH, Yin TC (1994a) Enhancement of neural synchronization in the anteroventral cochlear nucleus. I. Responses to tones at the characteristic frequency. *J Neurophysiol* 71: 1022-1036.
53. Joris PX, Smith PH, Yin TC (1994b) Enhancement of neural synchronization in the anteroventral cochlear nucleus. II. Responses in the tuning curve tail. *J Neurophysiol* 71: 1037-1051.
54. Kakizawa S, Yamasaki M, Watanabe M, Kano M (2000) Critical period for activity-dependent synapse elimination in developing cerebellum. *Journal of Neuroscience* 20: 4954-4961.
55. Kapfer, C. Aktivitätsabhängige Restriktion inhibitorischer Eingänge zu auditorischen Neuronen. 1999. Zoologisches Institut der Ludwigs-Maximilians-Universität München. Diplomarbeit.
56. Kapfer, C. 7-21-2003. Persönliche Mitteilung.
57. Kapfer C, Seidl AH, Schweizer H, Grothe B (2002) Experience-dependent refinement of inhibitory inputs to auditory coincidence-detector neurons. *Nature Neuroscience* 5: 247-253.
58. Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133-1138.
59. Keller-Peck CR, Walsh MK, Gan WB, Feng GP, Sanes JR, Lichtman JW (2001) Asynchronous synapse elimination in neonatal motor units: Studies using GFP transgenic mice. *Neuron* 31: 381-394.
60. Kelly JB, Masterton B (1977) Auditory sensitivity of the albino rat. *Journal of Comparative & Physiological Psychology* 91: 930-936.
61. Kelly JB, Phillips DP (1991) Coding of interaural time differences of transients in auditory cortex of *rattus norvegicus*: implications for the evolution of mammalian sound localization. *Hear Res* 55: 39-44.

62. Kiang NY, Watanabe T, Thomas C, Clark LF (1965) Discharge patterns of single fibres in the cat's auditory nerve. Cambridge, MA: MIT Press.
63. Kim G, Kandler K (2003) Elimination and strengthening of glycinergic/GABAergic connections during tonotopic map formation. *Nature Neuroscience* 6: 282-290.
64. Kneussel M, Betz H (2000) Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *Journal of Physiology-London* 525: 1-9.
65. Knudsen EI (2002) Instructed learning in the auditory localization pathway of the barn owl. *Nature* 417: 322-328.
66. Knudsen EI, Knudsen PF (1990) Sensitive and critical periods for visual calibration of sound localization by barn owls. *Journal of Neuroscience* 10: 222-232.
67. Kollmar, I. Plastizität im auditorischen Hirnstamm der mongolischen Wüstenrennmaus induziert durch akustisches Rauschen. 2003. Max-Planck-Institute of Neurobiology. Diplomarbeit.
68. Korn H, Oda Y, Faber DS (1992) Long-term potentiation of inhibitory circuits and synapses in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 440-443.
69. Kotak VC, Sanes DH (2000) Long-lasting inhibitory synaptic depression is age- and calcium-dependent. *Journal of Neuroscience* 20: 5820-5826.
70. Kuwabara N, Zook JM (1992) Projections to the medial superior olive from the medial and lateral nuclei of the trapezoid body in rodents and bats. *Journal of Comparative Neurology* 324: 522-538.
71. Kuwada S, Batra R, Yin TCT, Oliver DL, Haberly LB, Stanford TR (1997) Intracellular Recordings in Response to Monaural and Binaural Stimulation of Neurons in the Inferior Colliculus of the Cat. *Journal of Neuroscience* 17: 7565-7581.
72. Langford TL (1984) Responses elicited from medial superior olivary neurons by stimuli associated with binaural masking and unmasking. *Hearing Research*, vol 15: 39-50.
73. Leibold, C and van Hemmen, J L. Synaptic Plasticity governs the Type of Interaural-Time-Difference Representation. 2003. Unveröffentlichte Ergebnisse.

74. Liang F, Isackson PJ, Jones EG (1996) Stimulus-dependent, reciprocal up- and downregulation of glutamic acid decarboxylase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II gene expression in rat cerebral cortex. *Experimental Brain Research* 110: 163-174.
75. Lichtman JW, Colman H (2000) Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25: 269-278.
76. Loskota WJ, Lomax P, Verity MA (1974) A Stereotaxic Atlas of the Mongolian Gerbil Brain (*Meriones unguiculatus*). Michigan: Ann Arbor Science Publishers, Inc.
77. Maki, K, Furukawa, S, and Hirahara, T. Acoustical Cues for Sound Localization by Gerbils in an Ecological Realistic Environment. 26, 89. 2003. *Assoc. Res. Otolaryngol.*
78. Makous JC, Middlebrooks JC (1990) Two-dimensional sound localization by human listeners. *Journal of the Acoustical Society of America*, vol 87: 2188-2200.
79. McAlpine D, Jiang D, Palmer AR (1996) Interaural Delay Sensitivity and the Classification of Low Best-Frequency Binaural Responses in the Inferior Colliculus of the Guinea Pig. *Hearing Research* 97: 136-152.
80. McAlpine D, Jiang D, Palmer AR (2001) A neural code for low-frequency sound localization in mammals. *Nature Neuroscience* 4: 396-401.
81. McAlpine D, Grothe B (2003) Sound localization and delay lines - do mammals fit the model? *Trends in Neurosciences* 26: 347-350.
82. Morest DK (1968) The collateral system of the medial nucleus of the trapezoid body of the cat, its neuronal architecture and relation to the olivo-cochlear bundle. *Brain Res* 9: 288-311.
83. Nordeen KW, Killackey HP, Kitzes LM (1983) Ascending auditory projections to the inferior colliculus in the adult gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Journal of Comparative Neurology* 214: 131-143.
84. O'Leary DD, Ruff NL, Dyck RH (1994) Development, critical period plasticity, and adult reorganizations of mammalian somatosensory systems. *Current Opinion in Neurobiology* 4: 535-544.
85. Oda Y, Kawasaki K, Morita M, Korn H, Matsui H (1998) Inhibitory long-term potentiation underlies auditory conditioning of goldfish escape behaviour. *Nature* 394: 182-185.

86. Oliver DL, Beckius GE, Bishop DC, Loftus WC, Batra R (2003) Topography of Interaural Temporal Disparity Coding in Projections of Medial Superior Olive to Inferior Colliculus. *Journal of Neuroscience* 23: 7438-7449.
87. Osen KK (1969) Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *Journal of Comparative Neurology* 136: 453-484.
88. Paolini AG, FitzGerald JV, Burkitt AN, Clark GM (2001) Temporal processing from the auditory nerve to the medial nucleus of the trapezoid body in the rat. *Hearing Research* 159: 101-116.
89. Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press, Inc.
90. Pena JL, Viete S, Albeck Y, Konishi M (1996) Tolerance to sound intensity of binaural coincidence detection in the nucleus laminaris of the owl. *Journal of Neuroscience* 16: 7046-7054.
91. Perkins RE (1973) An electron microscopic study of synaptic organization in the medial superior olive of normal and experimental chinchillas. *Journal of Comparative Neurology* 148: 387-415.
92. Ramachandran R, May BJ (2002) Functional segregation of ITD sensitivity in the inferior colliculus of decerebrate cats. *J Neurophysiol* 88: 2251-2261.
93. Ramon y Cajal S (1907) *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres*. Paris: Maloine.
94. Rayleigh L (JW Strutt, 3rd Baron of Rayleigh) (1907) On our perception of sound direction. *Philos Mag* 13: 214-232.
95. Rogowski BA, Feng AS (1981) Normal postnatal development of medial superior olivary neurons in the albino rat: a Golgi and Nissl study. *Journal of Comparative Neurology* 196: 85-97.
96. Rose JE, Brugge JF, Anderson DJ, Hind JE (1967) Phase-locked response to low-frequency tones in single auditory nerve fibers of the squirrel monkey. *J Neurophysiol* 30: 769-793.
97. Rose JE, Gross NB, Geisler CD, Hind JE (1966) Some neural mechanisms in the inferior colliculus of the cat which may be relevant to localization of a sound source. *J Neurophysiol* 29: 288-314.
98. Russell FA, Moore DR (1995) Afferent reorganisation within the superior olivary complex of the gerbil - development and induction by neonatal, unilateral cochlear removal. *Journal of Comparative Neurology* 352: 607-625.

99. Ryugo DK (1992) The Auditory Nerve: Peripheral Innervation, Cell Body Morphology, and Central Projections. In: The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy, Vol 1 (Webster DB, Popper AN, Fay RR, eds), pp 23-65. New York: Springer.
100. Sanes DH (1993) The development of synaptic function and integration in the central auditory system. *Journal of Neuroscience* 13: 2627-2637.
101. Sanes DH, Takacs C (1993) Activity-dependent refinement of inhibitory connections. *European Journal of Neuroscience* 5: 570-574.
102. Schuett S, Bonhoeffer T, Hubener M (2002) Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *Journal of Neuroscience* 22: 6549-6559.
103. Schwartz IR (1992) The Superior Olivary Complex and Lateral Lemniscal Nuclei. In: The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy (Webster DB, Popper AN, Fay RR, eds), pp 117-167. New York: Springer.
104. Seidl, A. H. Altersabhaengige Restriktion glyzinerger Synapsen an der MSO der Wüstenrennmaus, *Meriones Unguiculatus*. 12-12-1999. Max-Planck-Institute of Neurobiology. Diplomarbeit.
105. Skottun BC (1998) Sound Localization and Neurons. *Nature* 393: 531.
106. Skottun BC, Shackleton TM, Arnott RH, Palmer AR (2001) The ability of inferior colliculus neurons to signal differences in interaural delay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 14050-14054.
107. Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL, Martin DL (1996) Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology* 373: 593-618.
108. Smith AJ, Owens S, Forsythe ID (2000) Characterisation of inhibitory and excitatory postsynaptic currents of the rat medial superior olive. *Journal of Physiology-London* 529: 681-698.
109. Smith PH, Joris PX, Yin TC (1993) Projections of physiologically characterized spherical bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat: evidence for delay lines to the medial superior olive. *Journal of Comparative Neurology* 331: 245-260.
110. Smith PH, Joris PX, Yin TC (1998) Anatomy and physiology of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) of the cat. *J Neurophysiol* 79: 3127-3142.

111. Spirou GA, Berrebi AS (1997) Glycine immunoreactivity in the lateral nucleus of the trapezoid body of the cat. *Journal of Comparative Neurology* 383: 473-488.
112. Spirou GA, Rowland KC, Berrebi AS (1998b) Ultrastructure of neurons and large synaptic terminals in the lateral nucleus of the trapezoid body of the cat. *J Comp Neurol* 398: 257-272.
113. Spirou GA, Rowland KC, Berrebi AS (1998c) Ultrastructure of neurons and large synaptic terminals in the lateral nucleus of the trapezoid body of the cat. *J Comp Neurol* 398: 257-272.
114. Spirou GA, Rowland KC, Berrebi AS (1998a) Ultrastructure of neurons and large synaptic terminals in the lateral nucleus of the trapezoid body of the cat. *J Comp Neurol* 398: 257-272.
115. Spitzer MW, Semple MN (1995) Neurons sensitive to interaural phase disparity in gerbil superior olive: diverse monaural and temporal response properties. *J Neurophysiol* 73: 1668-1690.
116. Stelzer A, Slater NT, ten Bruggencate G (1987) Activation of NMDA receptors blocks GABAergic inhibition in an in vitro model of epilepsy. *Nature* 326: 698-701.
117. Stern EA, Maravall M, Svoboda K (2001) Rapid development and plasticity of layer 2/3 maps in rat barrel cortex in vivo. *Neuron* 31: 305-315.
118. Sternberger LA, Sternberger NH (1983) Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 6126-6130.
119. Stotler W (1953) An Experimental Study of the Cells and Connections of the Superior Olivary Complex of the Cat. *The Journal of Comparative Neurology* 98: 401-431.
120. Taschenberger H, von Gersdorff H (2000) Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience* 20: 9162-9173.
121. Warr WB (1972) Fiber degeneration following lesions in the multipolar and globular cell areas in the ventral cochlear nucleus of the cat. *Brain Research* 40: 247-270.
122. Welker E, Soriano E, Dorfl J, Van der LH (1989) Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: transient increase of GAD-immunoreactivity following sensory stimulation. *Experimental Brain Research* 78: 659-664.

123. Wenthold RJ, Huie D, Altschuler RA, Reeks KA (1987) Glycine immunoreactivity localized in the cochlear nucleus and superior olivary complex. *Neuroscience* 22: 897-912.
124. Withington WDJ, Binns KE, Dhanjal S, Brickley SG, Keating MJ (1990) The maturation of the superior collicular map of auditory space in the guinea-pig is disrupted by developmental auditory deprivation. *European Journal of Neuroscience* 2 (8) 1990. 693-703..
125. Withington-Wray DJ (1990a) The Maturation of the Superior Collicular Map of Auditory Space in the Guinea-Pig is Disrupted by Developmental Auditory Deprivation. *European Journal of Neuroscience* 2.
126. Withington-Wray DJ (1990b) The Maturation of the Superior Collicular Map of Auditory Space in the Guinea-Pig is Disrupted by Developmental Visual Deprivation. *European Journal of Neuroscience* 2.
127. Withington-Wray DJ, Binns KE, Keating MJ (1990) A four-day period of bimodality auditory and visual experience is sufficient to permit normal emergence of the map of auditory space in the guinea pig superior colliculus. *Neuroscience Letters* 116: 280-286.
128. Wu SH (1999) Synaptic excitation in the dorsal nucleus of the lateral lemniscus. *Progress in Neurobiology* 57: 357-375.
129. Yin TC, Chan JC (1990) Interaural time sensitivity in medial superior olive of cat. *J Neurophysiol* 64: 465-488.
130. Yin TC, Kuwada S (1983) Binaural interaction in low-frequency neurons in inferior colliculus of the cat. III. Effects of changing frequency. *J Neurophysiol* 50: 1020-1042.

7.1 ABKÜRZUNGEN

AVCN	Anteroventral cochlear nucleus
BF	Bestfrequenz
CD	Characteristic delay
CN	Cochlear nucleus
Contra	Contralateral
CP	Characteristic phase
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole-2HCl
DNLL	Dorsaler nucleus des lateralen Lemniscus
IC	Inferior colliculus
ICC	Inferior colliculus central
ICX	Inferior colliculus external
IID	Interaural intensity differences
IPD	Interaural phase differences
Ipsi	Ipsilateral
ITD	Interaural time differences
LNTB	Lateral nucleus of trapezoid body
LSO	Lateral superior olive
LTD	Long term depression
LTP	Long term potentiation
MAP2	Microtubule associated protein 2
MNTB	Medial nucleus of trapezoid body
MSO	Medial superior olive
MSO	Medial superior olive
NL	Nucleus Laminaris
NGS	normal goat serum
P	Postnatal
PBS	Phosphate buffer solution
SC	Superior Colliculus
SOC	Superior olivary complex
SPN	Superior paraolivary nucleus

TDT	Tucker Davis Technologies
VCN	Ventral cochlear nucleus

7.2 IMMUNOHISTOCHEMIEPROTOKOLLE

A MAP2/Glyzinrezeptor-Immunohistochemie

Perfusion	5 min mit ACSF-Lösung, inkl. Heparin, Lidocain
Schockgefrierung	Gehirn wird nach der kurzen Perfusion schnell herauspräpariert und sofort in auf Trockeneis gekühltes Isopentan gelegt. Nach ca. 30 sek wird das Gehirn mit dem Isopentan für 5 min in flüssigen Stickstoff gestellt. Gefrorenes Gehirn wird in Alufolie gewickelt und in –80°C aufbewahrt.
Schneiden im Kryostat	Das gefrorene Gehirn wird mit etwas TissueTek auf den Halteblock des Kryostats festgefroren und anschließend mittels eines Gefäßes (siehe Abbildung) vollständig mit gefrorenem TissueTek umschlossen. Es wurden 25µm Schnitte angefertigt und auf gelatinierte Objektträger aufgezogen. Die Schnitte müssen vollständig auf den Objektträger antrocknen und werden anschließen bis zur Färbung auf Trockeneis gelagert.
Fixierung	Objektträger mit Schnitten für 8 min in 4% Paraformaldehyd
Waschen	5 mal 10 min in PBS 0,1M
PapPen-Ringe	Objektträger rund um Schnitte abtrocknen, PapPen-Ring um Schnitte ziehen und Schnitt sofort mit einem Tropfen PBS 0,1 M anfeuchten. Alle weiteren Schritte erfolgen direkt auf dem Objektträger, Flüssigkeitsmenge pro Schnitt 100µl. Waschen erfolgt in Küvetten.
Zerstörung endogener Peroxidaseaktivität	10 min 10% Methanol, 3% H ₂ O ₂ in PBS

Waschen	3 mal 10 min PBS
Permeabilisierung der Membran und Präinkubation 1	1 h 0,5% Triton x100+ 10% NGS in PBS
Permeabilisierung der Membran und Präinkubation 2	10 min 0,5% Triton x100 + 2% NGS in PBS
Inkubation 1. Antikörper	Mind. 12h in 4°C, 50 µl pro Schnitt GlyR (Alexis) 1:100 MAP2 (Sigma) 1:100 in PBS mit 0,5% Triton x100+ 2% NGS
Waschen	3 mal 10 min PBS
Inkubation 2. Antikörper Ab diesem Arbeitsschritt soweit wie möglich in Dunkelheit arbeiten!	1 h bei Raumtemperatur, 50 µl pro Schnitt goat anti-rabbit-Cy3 (Dianova) 1:300 goat anti-mouse Alexa488 (MolProbes) 1:200 in PBS mit 2% NGS
Waschen	3 mal 10 min PBS
Eindecken	Ohne die Schnitte trocken werden zu lassen mit GelMount eindecken.

B SMRI 32/Glyzinrezeptor

Perfusion	5 min mit ACSF-Lösung, inkl. Heparin, Lidocain
Schockgefrierung	Gehirn wird nach der kurzen Perfusion schnell herauspräpariert und sofort in auf Trockeneis gekühltes Isopentan gelegt. Nach ca. 30 sek wird das Gehirn mit dem Isopentan für 5 min in flüssigen Stickstoff gestellt. Gefrorenes Gehirn wird in Alufolie gewickelt und in –80°C aufbewahrt.

Schneiden am Kryostat	Das gefrorene Gehirn wird mit etwas TissueTek auf den Halteblock des Kryostats festgefroren und anschließend mittels eines Gefäßes (siehe Abbildung) vollständig mit gefrorenem TissueTek umschlossen. Es wurden 25µm Schnitte angefertigt und auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen. Die Schnitte müssen vollständig auf den Objektträger antrocknen und werden anschließend bis zur Färbung auf Trockeneis gelagert.
Fixierung	Objektträger mit Schnitten für 8 min in 4% Paraformaldehyd
Waschen	5 mal 10 min in TBS 0,1M
PapPen-Ringe	Objektträger rund um Schnitte abtrocknen, PapPen-Ring um Schnitte ziehen und Schnitt sofort mit einem Tropfen TBS 0,1 M anfeuchten. Alle weiteren Schritte erfolgen direkt auf dem Objektträger, Flüssigkeitsmenge pro Schnitt 100µl. Waschen erfolgt in Küvetten.
Zerstörung endogener Peroxidaseaktivität	10 min 10% Methanol, 3% H ₂ O ₂ in PBS
Waschen	3 mal 10 min PBS
Permeabilisierung der Membran und Präinkubation 1	1 h 0,5% Triton x100+ 10% NGS in TBS
Permeabilisierung der Membran und Präinkubation 2	10 min 0,5% Triton x100 + 2% NGS in TBS
Inkubation 1. Antikörper	Mind. 12h in 4°C, 50 µl pro Schnitt GlyR (Alexis) 1:100 MAP2 (Sigma) 1:100 in TBS mit 0,5% Triton x100+ 2% NGS
Waschen	3 mal 10 min PBS
Inkubation 2. Antikörper Ab diesem Arbeitsschritt soweit wie möglich in Dunkelheit arbeiten!	1 h bei Raumtemperatur, 50 µl pro Schnitt goat anti-rabbit-Cy3 (Dianova) 1:300 goat anti-mouse Alexa488 (Molecular Probes) 1:200 in TBS mit 2% NGS
Waschen	3 mal 10 min TBS

Eindecken	Ohne die Schnitte trocken werden zu lassen mit GelMount eindecken.
-----------	--

C Synaptophysin/Gephyrin-Immunohistochemie

Perfusion	5 min ACSF mit Lidocain und Heparin 45 min 4% PFA in PBS pH 7,4
Nachfixierung	5h, max ÜN in 4% PFA
Kryoprotektion	2h 10% Sacharose (in PBS), 20% Sacharose bis Absinken, 30% Sacharose bis Absinken
Schneiden	25 µm Schnitte am Gefriermikrotom. Schnitte werden freischwimmend in PBS aufgefangen
Vorbereiten der Schnitte	Schnitte werden auf gelatinierte Objektträger aufgezogen und angetrocknet. PapPen Ring um Schnitte.
Waschen	3 mal 10 min in PBS
Zerstörung endogener Peroxidaseaktivität	10 min 10% Methanol + 3% H ₂ O ₂ PBS
Triton Inkubation und Präinkubation	1 h 0,1% Triton x100 + 10% NGS in PBS
Inkubation 1. Antikörper	Mind. 12 h bei 4°C, Gephyrin 1:500, Synaptophysin 1:500 in PBS plus 0,1% Triton x100 + 2% NGS
Waschen	3 mal 10 min PBS
Inkubation 2. Antikörper	1 h bei Raumtemperatur, goat anti-mouse Alexa 488 (Molecular Probes) 1:300, goat anti-rabbit Cy3 (Dianova) 1:600 in PBS mit 2% NGS
Waschen	3 mal 10 min PBS
Eindecken	Ohne die Schnitte trocken werden zu lassen mit GelMount eindecken.

D MAP2/Dapi-Färbung

Perfusion	5 min ACSF mit Lidocain und Heparin 45 min 4% PFA in PBS pH 7,4
-----------	--

Nachfixierung	5h, max ÜN in 4% PFA
Kryoprotektion	2h 10% Sacharose (in PBS) 20% Sacharose bis Absinken 30% Sacharose bis Absinken
Schneiden	25 µm Schnitte am Gefriermikrotom. Schnitte werden freischwimmend in PBS aufgefangen
Vorbereiten der Schnitte	Schnitte werden auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und angetrocknet. Objektträger rund um Schnitte abtrocknen, PapPen-Ring um Schnitte ziehen und Schnitt sofort mit einem Tropfen PBS 0,1 M anfeuchten. Alle weiteren Schritte erfolgen direkt auf dem Objektträger, Flüssigkeitsmenge pro Schnitt 100µl. Waschen erfolgt in Küvetten.
Permeabilisierung der Membran und Präinkubation 1	1 h 0,5% Triton x100+ 10% NGS in PBS
Inkubation 1. Antikörper	Mind. 12h bei 4°C, 50 µl pro Schnitt MAP2 (Sigma) 1:100 in PBS mit 0,5% Triton x100+ 1% NGS
Waschen	3 mal 10 min PBS
Inkubation 2. Antikörper Ab diesem Arbeitsschritt soweit wie möglich in Dunkelheit arbeiten!	1 h bei Raumtemperatur, 50 µl pro Schnitt goat anti-mouse-Cy3 (Dianova) 1:500 in PBS mit 0,5% Triton
Dapi-Färbung	10 min Dapi 1:100 in PBS
Waschen	3 mal 10 min in PBS
Eindecken	Ohne die Schnitte trocken werden zu lassen mit GelMount eindecken.

7.2.1 DAB-IMMUNOHISTOCHEMIE

Für die Quantifizierung der Verteilung von inhibitorischen Markern auf Ratten MSO-neuronen und der elektronenmikroskopischen Untersuchungen von MSO-neuronen von Wüstenrennmäusen wurde eine DAB-Immunoreaktion verwendet. Die Aufnahme dieser Färbungen erfolgte unter einem normalen Lichtmikroskop

Perfusion	5 min mit ACSF-Lösung, inkl. Heparin, Lidocain anschliessend 45 min mit 4% Paraformaldehyd mit 0,4% Glutaraldehyd (25%ig), pH 7,4
Postfixierung	Über Nacht in Fixativ, mindestens aber 5h, danach in Phosphatpuffer 0,1 M
Schneiden	Vibratom Campden Instruments LTD mit Eigenanbau von Zeiss Binokular Einbetten von Gehirn in Agar Schnittdicke 100 µm Auffangen in Phosphatpuffer 0,1M
Waschen	3 mal 10 min PBS
Zerstörung der endogenen Peroxidase	10 min 10% Methanol + 3% H ₂ O ₂ in PBS 0,1 M
Reduktion der Hintergrundfärbung	30 min 22 mg Na-Borohydrid in 12 ml PBS 0,1 M
Waschen	4 mal 10 min PBS
Präinkubation	60 min 10% NGS in PBS
Inkubation 1. Antikörper	12-20 h Gephyrin 1:100 in PBS mit 10% NGS
Waschen	3 mal 10 min PBS
Inkubation 2. Antikörper	3 h goat-anti-mouse Biotin 1:200 in PBS mit 2% NGS
Waschen	3 mal 10 min PBS
Inkubation 3. Antikörper	1 h tert. Antikörper ABC-Komplex 1:100 (Mischungsverhältnis Lsg. A : Lsg. B = 1:1) in AP2 (Lösung 30 min vor Gebrauch ansetzen um die Bildung des ABC-Komplexes zu ermöglichen)
Waschen	3 mal 10 min Tris Puffer 0,05 M
DAB-Reaktion 1	10 min 0,05% DAB in 0,1 M PB
DAB Reaktion 2	Ca. 9 min 0,05% DAB + 0,01% H ₂ O ₂ in 0,1 M PB (Reaktionszeit in zweiter Färbung richtet sich nach dem Fortschreiten der Reaktion. Sobald die Schnitte eine mittelbraune Färbung zeigen, wird die Reaktion abgebrochen.)

Waschen	3 mal 10 min PBS 0,1 M
Nachfixierung für EM	6 Tage bei 4°C in 4% Glutaraldehyd (Bouoin's Medium) 1h in 1% Osmium Einbetten in Araldit Schneiden Ultracut (LKB) Mikroskopieren Zeiss EM 10

7.2.2 GEPHYRIN-DAB (RATTE)

Perfusion	5 min mit ACSF-Lösung, inkl. Heparin, Lidocain anschliessend 45 min mit 4% Paraformaldehyd mit 0,4% Glutaraldehyd (25%ig), pH 7,4
Postfixierung	Über Nacht in Fixativ, mindestens aber 5h, danach in Phosphatpuffer 0,1 M
Schneiden	Vibratom Campden Instruments LTD mit Eigenanbau von Zeiss Binokular Einbetten von Gehirn in Agar Schnittdicke 100 µm Auffangen in Phosphatpuffer 0,1M
Waschen	3 mal 10 min PBS
Zerstörung der endogenen Peroxidase	10 min 10% Methanol + 3% H ₂ O ₂ in PBS 0,1 M
Reduktion der Hintergrundfärbung	30 min 22 mg Na-Borohydrid in 12 ml PBS 0,1 M
Waschen	4 mal 10 min PBS
Präinkubation	60 min 10% NGS in PBS + 0,1% Triton
Inkubation 1. Antikörper	12-20 h Gephyrin 1:100 in PBS mit 10% NGS und 0,1 Triton
Waschen	3 mal 10 min PBS
Inkubation 2. Antikörper	3 h goat-anti-mouse Biotin 1:200 in PBS mit 2% NGS
Waschen	3 mal 10 min PBS
Inkubation 3. Antikörper	1 h tert. Antikörper ABC-Komplex 1:100

	(Mischungsverhältnis Lsg. A : Lsg. B = 1:1) in AP2 (Lösung 30 min vor Gebrauch ansetzen um die Bildung des ABC-Komplexes zu ermöglichen)
Waschen	3 mal 10 min Tris Puffer 0,05 M
DAB-Reaktion 1	10 min 0,05% DAB in 0,1 M PB
DAB Reaktion 2	Ca. 9 min 0,05% DAB + 0,01% H ₂ O ₂ in 0,1 M PB (Reaktionszeit in zweiter Färbung richtet sich nach dem Fortschreiten der Reaktion. Sobald die Schnitte eine mittelbraune Färbung zeigen, wird die Reaktion abgebrochen.)
Waschen	3 mal 10 min PBS 0,1 M
Entwässern der Schnitte	Je 3 min in 2x70% Ethanol, 2x96% Ethanol, 2x100% Isopropanol, 3x Xylol
Eindecken der Schnitte	Direkt nach der letzten Xylolstufe (Schnitte nicht abtrocknen lassen) werden die Objektträger mit einem Deckglas und GelMount abgedeckt.

7.3 VERÖFFENTLICHUNGEN

Der erste Teil dieser Dissertation wurde publiziert in “Experience-dependent refinement of inhibitory inputs to auditory coincidence-detector neurons”, Nature Neuroscience, volume 5 no 3, März 2002.

Weitere Ergebnisse wurden auf verschiedenen Tagungen vorgestellt und sind bereits bei einem Fachmagazin eingereicht.

7.4 MITGLIEDER DER ABTEILUNG BONHOEFFER UND ARBEITSGRUPPE GROTHE WÄHREND MEINER DOKTORARBEIT

Albrecht	Kossel
Angelica	Zapata
Anna	Magnusson
Antje	Brand
Baudoux	Sylvie
Benedikt	Grothe
Christian	Lohmann
Christoph	Kapfer
Claire	Creutzfeldt
Claudia	Marget-Hahn
Claudia	Roth-Alpermann
Dorit	Polnau
Gerhard	Breutel
Harald	Rösch
Heike	Müller
Ida	Kollmar
Iris	Kehrer
Jasmin	Jonas
Jenny	Köhler
Koichi	Tomita
Maria	Berzaghi
Marianne	Braun
Mark	Huebener
Marta	Zagrebelsky-Holz
Martin	Korte
Max	Sperling
Michael	Pecka
Miguel	Vaz Afonso

Nicola	Tobisch
Olesegun	Momoh
Phillip	Brownell
Rosalina	Fonseca
Sidney	Cambridge
Sonja	Hofer
Susanne	Lang
Sven	Schütt
Sylvie	Baudoux
Thom	Park
Thomas	Zahn
Tini	Reiter
Tobias	Bonhoeffer
Tom	Mrsic-Flögel
Torsten	Marquardt
Ursula	Koch
Valentin	Nägerl
Vilem	Bulka
Volker	Staiger

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Vorname, Name	Armin H. Seidl
Geburtsdatum	23. Februar 1973, in München
Eltern	Franziska Seidl (geb. Fischer) Johann Seidl
Adresse	Schönfeldstraße 28, 1. Aufgang 80539 München
Telefon	+49 (89) 17997658
Email	arminseidl@neuro.mpg.de
Staatsangehörigkeit	deutsch

AUSBILDUNG

Schule	9/79 – 07/83	Grundschule an der Türkenstraße in München
	09/83 – 07/92	Luitpold-Gymnasium München
	07/92	Abitur
Zivildienst	09/92 – 10/93	Schwerstbehindertenbetreuung und Lehrtätigkeit and der Bayrischen Landesschule für Körperbehinderte
Universität	11/93 – 12/99	Studium in Biologie, Chemie und Pädagogik an der Ludwigs-Maximilians- Universität in München
	12/99	Abschluss als Diplombiologe Titel der Diplomarbeit: "Altersabhängige Restriktion glyzinerger Synapsen an der MSO der Wüstenrennmaus, <i>Meriones unguiculatus</i> "
	03/00 – jetzt	Dissertation am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried unter der Leitung von Prof. Benedikt Grothe

AUßERWISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

11/97 – 12/99	Freiberufliche Tätigkeit bei Trion Backoffice GmbH, Projektunterstützung für verschiedene Unternehmensberatungen im In- und Ausland
---------------	---